



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RAQUEL SILVA DOS REIS

**POTENCIALIDADE DOS GENES *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e
RUNX3 COMO BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS NO
CÂNCER ORAL**

**VITÓRIA
2014**

RAQUEL SILVA DOS REIS

**POTENCIALIDADE DOS GENES *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e
RUNX3 COMO BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS NO
CÂNCER ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

VITÓRIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

R375p Reis, Raquel Silva dos, 1986-
Potencialidade dos genes CD44, DAPK, MGMT e RUNX3
como biomarcadores epigenéticos no câncer oral / Raquel Silva
dos Reis. – 2014.
85 f. : il.

Orientador: Iúri Drumond Louro.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Metilação. I. Louro,
Iúri Drumond. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

RAQUEL SILVA DOS REIS

**POTENCIALIDADE DOS GENES *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e
RUNX3 COMO BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS NO
CÂNCER ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em ____ de _____ de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. Dr^a. Flavia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinadora interna

Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho
Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Examinador externo

Prof^a. Dr^a. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva
Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo
Examinadora externa

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor de tudo o que sou, tenho e faço.

A minha família, especialmente aos meus pais, Antonio e Ana, pelo amor e apoio incondicional. Aos meus irmãos Eduardo, Sandro e Alexandre pelo carinho e por serem as pessoas com as quais eu sempre poderei contar. Aos meus avós, Dudu e Maria, pelo afeto sempre evidente em cada encontro.

Ao Prof. Dr. Iúri Drumond Louro, pela orientação e pelo incentivo à excelência nos vários aspectos desta vida.

À Melissa, pela atenção e disponibilidade em todas as fases de realização do trabalho e pelos direcionamentos sempre dados com paciência.

Aos professores Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho, Dr^a. Flavia de Paula e Dr^a. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva, por aceitarem compor a banca examinadora.

Aos amigos de épocas passadas, nem sempre próximos.

À Quezia, pelo presente de sua amizade e companheirismo. Nossas conversas, conselhos e momentos de convívio têm sido um prazer.

À Elaine Stur e Lidianne Pignaton, parceiras de laboratório, pelos risos e pelas dicas fornecidas durante a execução dessa pesquisa e elaboração desta dissertação.

À Jéssica Aflávio, Marília Arantes e Isabella Bittencourt pela ajuda nas análises moleculares.

A todos os companheiros de NGHM, Leila, Daniela, Clara, Raquel Spinassé, Fernando, Vitor Stange, Vitor Aguiar, Fernanda, Gabriela, Lucas, Márcio e Diego.

Aos amigos da Igreja Batista em Sotelândia.

Aos colegas da turma de mestrado do ano de 2013.

À UFES e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela possibilidade de desenvolver esse trabalho e obter o título de mestre.

À FAPES, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo.

Ao Laboratório de Patologia Molecular, representado pela Prof^a Dr^a.Sandra Ventorin von Zeidler, por permitir o uso das amostras de DNA utilizadas nesse estudo, e aos colegas deste mesmo laboratório pelos momentos de descontração.

À equipe do serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (AFECC), pelo fornecimento das amostras tumorais.

Ao LABIOM, laboratório multiusuário do Centro de Ciências da Saúde.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

Recomeçar

*Não importa onde você parou...
em que momento da vida você cansou...
o que importa é que sempre é possível e
necessário “Recomeçar”.*

*Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...
é renovar as esperanças na vida e o mais
importante...
acreditar em você de novo.
Sofreu muito nesse período?
foi aprendizado...
Chorou muito?
foi limpeza da alma...*

*Ficou com raiva das pessoas?
foi para perdoá-las um dia...*

*Sentiu-se só por diversas vezes?
é porque fechaste a porta até para os anjos...
Acreditou que tudo estava perdido?
era o início da tua melhora...*

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

O câncer oral possui alta incidência e taxa de mortalidade em diversas regiões do mundo, sendo o carcinoma epidermoide seu tipo histológico mais comum. Durante a tumorigênese, a hipermetilação de ilhas CpG é considerada um importante mecanismo de silenciamento gênico, podendo estar associada aos fatores de risco como o consumo de álcool e tabaco. Os genes *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3* participam de vias relacionadas a adesão celular, apoptose, reparo do DNA e proliferação. No intuito de estudar a associação entre a hipermetilação e características clínicas do paciente e do tumor, o perfil de metilação destes genes foi avaliado por *MS-PCR* (PCR específica para metilação) em um total de 85 amostras de carcinoma epidermoide oral. As frequências de hipermetilação obtidas para *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3* foram 41,2%, 20,5% e 1,5%, respectivamente. Nenhuma amostra positiva foi detectada para *CD44*. A hipermetilação em pelo menos uma dessas regiões foi constatada em 51,7% dos casos. Tumores simultaneamente positivos para *DAPK* e *MGMT* somaram 10,6%. Uma associação significativa foi verificada entre *MGMT* e o sítio anatômico cavidade oral ($p = 0,0234$). Nessa região, a combinação entre a deficiência no reparo de adutos e a exposição intensa aos carcinógenos alquilantes (como as N-nitrosaminas do tabaco) pode ter importante efeito na promoção do câncer. Desta forma, pode-se propor que pacientes com tumores na cavidade oral positivos para hipermetilação em *MGMT* responderiam melhor à quimioterapia com agentes alquilantes. Em vista das frequências de hipermetilação observadas e da relação com dados clinicopatológicos, os genes *DAPK* e *MGMT* mostram potencialidade como biomarcadores de prognóstico no carcinoma epidermoide oral.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide oral. *CD44*. *DAPK*. *MGMT*. *RUNX3*. Hipermetilação. *MS-PCR*.

ABSTRACT

Oral cancer shows high incidence and mortality rate in various regions of the world, being squamous cell carcinoma its most common histological type. During tumorigenesis, hipermethylation of CpG islands is considered an important mechanism of gene silencing, possibly associated with risk factors, such as tobacco and alcohol consumption. *CD44*, *DAPK*, *MGMT* and *RUNX3* genes participate in signaling pathways related to cell adhesion, apoptosis, DNA repair and proliferation. Aiming to study the association of hypermethylation and patient clinical characteristics, gene methylation profile was evaluated by *MS-PCR* (methylation specific PCR) in 85 samples of oral squamous cell carcinoma. Hypermethylation frequencies of *DAPK*, *MGMT* and *RUNX3* were 41.2%, 20.5% and 1.5%, respectively. Positivity was not detected for *CD44*. Hypermethylation was found for at least one region in 51.7% of cases. *DAPK* and *MGMT* simultaneously positive tumors added to 10.6%. A significant association was found for *MGMT* and the oral cavity ($p = 0.0234$). In this region, the combination of adduct repair deficiency and intense alkylating carcinogen exposure (i.e.: tobacco specific nitrosamines) may have an important effect in cancer promotion. Therefore, it seems plausible that patients with *MGMT* hypermethylation positive oral tumors would respond better to chemotherapy with alkylating agents. Owing to the hypermethylation frequencies observed and correlation with clinicopathological data, *DAPK* and *MGMT* genes showed potential role as biomarkers in oral squamous cell carcinomas.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. *CD44*. *DAPK*. *MGMT*. *RUNX3*. Hypermethylation. *MS-PCR*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito da acetilação de histonas no enovelamento da cromatina.....	32
Figura 2: Conversão de uma base citosina para 5-metilcitosina por uma DNA metiltransferase (DNMT).	33
Figura 3: Padrão de metilação do DNA em células normais..	34
Figura 4: A metilação e outras alterações epigenéticas e sua influência na regulação da expressão gênica.	36
Figura 5: Algumas das alterações genéticas e epigenéticas que acompanham o desenvolvimento do CEO.	39
Figura 6: Esquema estrutural do gene <i>CD44</i>	41
Figura 7: Localização da ilha CpG do gene <i>CD44</i>	42
Figura 8: Atuação da proteína <i>Dapk</i> na promoção da morte celular.	45
Figura 9: Região promotora e ilha CpG do gene <i>MGMT</i>	47
Figura 10: Organização do gene <i>RUNX3</i>	49
Figura 11: Localização da principal ilha CpG do gene <i>RUNX3</i>	50
Figura 12: Ação supressora tumoral do gene <i>RUNX3</i> por meio da via de sinalização do <i>TGFβ</i>	51
Figura 13: Etapas de conversão de uma base citosina não metilada em uracila na presença de bissulfito de sódio (NaHSO_3).	57
Figura 14: Géis representativos da eletroforese dos produtos de <i>MS-PCR</i> dos genes <i>CD44</i> , <i>DAPK</i> , <i>MGMT</i> e <i>RUNX3</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de avaliação dos parâmetros do sistema TNM para CEO.....	28
Tabela 2: Agrupamento por Estádios segundo a classificação TNM.	29
Tabela 3: Perfil de metilação e função de genes relacionados ao CEO.	40
Tabela 4: Sequência dos primers, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos na <i>MS-PCR</i>	58
Tabela 5: Descrição clinicopatológica do total de amostras avaliadas para cada gene.	64
Tabela 6: Variáveis clinicopatológicas e sua relação com a hipermetilação dos genes <i>DAPK</i> , <i>MGMT</i> e <i>RUNX3</i>	65

LISTA DE SIGLAS

ADH – Álcool-desidrogenase
AFECC – Hospital Santa Rita de Cássia
ALDH – Aldeídodesidrogenase
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
AP-1/2 – Fator de transcrição proteína ativadora 1/2
APC - Adenomatous polyposis coli
BIM – Bcl-2 interacting mediator of cell death
BPDE – Benzo- α -pireno diol epóxido
BRCA1 - Breast cancer 1
CaMKK – CaM-regulated kinase kinase
cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina
CBF β – Core-binding factor-beta subunit
CCBP – Carcinoma de células basais da pele
CE – Carcinoma epidermoide
CECP – Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
CEO – Carcinoma epidermoide oral
CD44 - Cluster of Differentiation 44
CDH1/13 - Cadherin 1/13
CDK – Cyclin-dependent kinase
CDKN1A (p21) - Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CDKN2A (p16/p14) – Cyclin-dependent kinase 2A
CDKN2B (p15) – Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
CHFR – Checkpoint with forkhead and ring finger domains
CID – Código internacional de doenças
CREB - cAMP responsive element binding protein
cTNM – TNM clínico
CXCL14 – Chemokine (C-X-C motif) ligand 14
DAPK1/2/3 – Death associated protein kinase 1/2/3
DCC – DCC netrin 1 receptor
DMN - Dimetilnitrosamina
DNMT1/3A/3B – DNA metiltransferase 1/3A/3B

dNTP – Desoxinucleotídeo trifosfato

E6 /7– Early protein 6/7

EBNA2 - Human herpesvirus 4 (Epstein-Barr virus)

EDNRB – Endothelin receptor type B

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

E2F – Fator de transcrição E2F

EGFR – Epidermal growth factor receptor

EPCAM – Epithelial cell adhesion molecule

EphA4 – EPH receptor A4

ERK – Extracellular signal-regulated kinase

EZH2 – Enhancer of zeste homologue 2

FoxO3 – Forkhead box O3

_{FT}Runx3 – Fator de transcrição *RUNX3*

GSTP1 – Glutathione S-transferase pi 1

HAT – Histona acetiltransferases

HDAC – Histona desacetilases

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

hMLH1 - Mut L homologue 1

HPV – Papilomavírus humano

HPV-16/18 – Papilomavírus humano subtipo 16/18

HRAS – Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

IGF2/βP2 – Insulin-like growth factor 2/βP2

INCA – Instituto nacional do câncer

IFNγ – Interferon gama

Ku70 (*XRCC6*) – *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6*

LINE – Long interspersed nuclear elements

LOH – Loss of heterozygosity

MBD1/2/3 – Methyl-CpG binding domain protein 1/2/3

MeCP2 – Methyl CpG binding protein 2

Mdm2 – E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2

MGMT – O-6-methylguanine-DNA methyltransferase

MLC – myosin light chain

MLH1 – mutL homolog 1

MS-PCR – PCR metilação específica
 MYC – *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*
 NFkB – Fator nuclear kappa beta
 NNN - N'-nitrosonornicotina
 NNK - 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona
 p19^{ARF} – Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A, isoforma 3
 p21 – Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
 p53 – Proteína tumoral 53
 PC9 – Fenol-clorofórmio em pH 9
 PCR – Reação em cadeia da polimerase
 P450E1 - Citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídeo 1
 PEBP2β – *Polyomavirus enhancer-binding protein 2 beta subunit*
 pRb – Proteína retinoblastoma
 pTNM – TNM patológico
 QMSP - *real-time quantitative methylation-specific PCR*
 Rb – Retinoblastoma
 RBE 1/2 - *RUNX binding elements 1/2*
 rpm – rotações por minuto
 RARβ – *Retinoic acid receptor beta*
 RASSF1A – *Ras association domain family member 1*
 RT-PCR – *Reverse transcription polymerase chain reaction*
 RUNX 1/ 2/ 3 – *Human runt-related transcription factor 1/2/3*
 SAM – S-adenosilmetionina
 SDS - Dodecil sulfato de sódio
 Shh – *Sonic Hedgehog*
 SINE - *Short interspersed nuclear elements*
 Smad – *Mothers against decapentaplegic homolog*
 SP1 - *Specificity Protein 1*
 TE9 – Tris-EDTA pH 9
 TGF-β – *Transforming growth factor-β*
 TNF – Fator de necrose tumoral
 TNM – Sistema *tumor-node-metastasis*
 TP53 – *Tumor protein 53*
 Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

TSNA – N-nitrosaminas tabaco específicas derivadas de alcalóides não voláteis

TSS – Transcription start site

5' UTR - 5' Untranslated Region

VEGF – Vascular endothelial growth factor

VHL – von Hippel-Lindau

WHO – World Health Organization

Wnt – Wingless-type

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO GERAL DE BIBLIOGRAFIA	19
2.1	O Câncer Oral	19
2.1.1	DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA	19
2.1.2	FATORES DE RISCO	21
2.1.3	SINTOMAS, DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO	27
2.2	A Metilação como Evento Epigenético	31
2.3	A Metilação e o Câncer	36
2.4	A Hipermetilação e o Carcinoma Epidermoide Oral	38
2.5	Estrutura e Função dos Genes <i>CD44</i>, <i>DAPK</i>, <i>MGMT</i> e <i>RUNX3</i>	41
2.5.1	O GENE <i>CD44</i>	41
2.5.2	O GENE <i>DAPK</i>	44
2.5.3	O GENE <i>MGMT</i>	47
2.5.4	O GENE <i>RUNX3</i>	49
3	OBJETIVOS	53
3.1	Objetivo Geral	53
3.2	Objetivos Específicos	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1	Pacientes	54
4.1.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	54
4.1.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	54
4.1.3	QUESTÕES ÉTICAS	55
4.2	Amostras Tumorais	55
4.3	Extração do DNA Tumoral	55
4.4	Quantificação do DNA	56
4.5	Modificação do DNA por Bissulfito de Sódio	56
4.6	MS-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase específica para Metilação	57
4.7	Eletroforese	59
4.8	Registro, Organização e Análise Estatística dos Resultados	60
5	RESULTADOS	62
6	DISCUSSÃO	66

7	CONCLUSÕES.....	72
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

O câncer oral é uma doença comum em diversos países, incluindo o Brasil (FERLAY et al., 2012). O carcinoma epidermoide oral (CEO) é seu tipo histológico mais frequente, correspondendo a mais de 90% dos tumores que atingem essa região anatômica (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). O termo câncer oral refere-se aos tumores localizados no lábio, na cavidade oral e na orofaringe (BORGES et al, 2009; LLEWELLY, JOHNSON e WARNAKULASURIYA, 2001).

Os principais fatores de risco incluem o consumo prolongado e abusivo de álcool e tabaco, que estabelecem entre si uma relação sinérgica e dose-dependente (PETTI, 2009).

Nos últimos 30 anos, apesar dos avanços em termos de diagnóstico e tratamento, os valores de incidência e prevalência continuam elevados e a taxa de sobrevida em 5 anos não têm tido melhora significativa, permanecendo em torno de 50%. Muitos casos são diagnosticados em estágios já avançados. Isso resulta em prognósticos desfavoráveis e traz complicadores para a abordagem terapêutica (WARNAKULASURIYA, 2009). Embora sejam convencionais na prática clínica, a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia são abordagens não seletivas com potencial danoso às células normais. Mesmo naquelas modalidades de tratamento combinado, os pacientes sofrem com a deformidade facial após cirurgias radicais e com a severa toxicidade causada pela quimioterapia (MOON et al, 2013).

Nesse sentido, o uso de biomarcadores pode representar uma ferramenta útil a medida em que possibilite associações com características clínicas e tumorais. Pesquisas focadas na genética e na epigenética de CEO proporcionam uma compreensão mais apurada de sua patogênese molecular e a determinação de quais eventos têm relação com a evolução do carcinoma. Isso abre caminhos para prospecção de novos biomarcadores e para definição de quais vias e mecanismos cuja intervenção teria efeito na inibição e eliminação das células tumorais.

Uma das principais alterações epigenéticas é a hipermetilação de genes relacionados ao câncer. De maneira análoga às mutações, este evento também resulta no silenciamento transcricional e tem sido considerado um evento precoce no desenvolvimento tumoral. Tendo em vista que o diagnóstico nos estágios iniciais tem efeito significativo na taxa de sobrevida e no sucesso do tratamento, a hipermetilação pode ser um bom biomarcador. De fato, existem estudos bem-sucedidos em relacioná-la com características clinicopatológicas (YALNIZ et al., 2011). Deve-se destacar ainda que, diferentemente das mutações, marcas epigenéticas são potencialmente reversíveis, o que torna a hipermetilação um alvo promissor para terapias (YOO et al., 2006).

Estudos prévios têm descrito os genes *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3* como influentes no processo oncogênico, com vias de atuação que abrangem adesão celular, apoptose, reparo do DNA e bloqueio proliferativo (SUPIC et al., 2011b). Em células de diversas neoplasias, a hipermetilação é apontada como um dos principais mecanismos responsáveis pela inativação transcricional destas mesmas regiões (SANTORO et al., 2012). A proposta desse trabalho foi avaliar a presença de hipermetilação nestes genes em tumores de CEO, bem como sua possível relação com aspectos clinicopatológicos. A longo prazo esta pesquisa, assim como suas similares, vislumbra contribuir para qualidade de vida do paciente com câncer e para redução dos gastos com medicamentos, internações prolongadas e múltiplas terapias antineoplásicas.

2 REVISÃO GERAL DE BIBLIOGRAFIA

2.1 O Câncer Oral

2.1.1 DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA

O câncer oral é um dos subtipos do chamado câncer de cabeça e pescoço e se inclui dentre os tumores malignos situados no trato aerodigestivo superior. Nas últimas décadas mantém-se mundialmente como um dos tipos mais frequentes de câncer. O carcinoma epidermoide oral (CEO) é seu tipo histológico mais comum, correspondendo a mais de 90% dos casos (RODRIGUES et al., 1998).

O carcinoma epidermoide (CE) pode ser definido como uma neoplasia epitelial invasiva com vários níveis de diferenciação escamosa e propensão à metástase de linfonodo precoce e extensiva ocorrendo principalmente em usuários adultos de álcool e tabaco por volta dos 50 ou 60 anos de idade (BARNES et al., 2005).

O câncer oral abrange lesões na cavidade oral e na orofaringe, excluindo as neoplasias malignas situadas na nasofaringe, hipofaringe e glândulas salivares maiores (BORGES et al, 2009; LLEWELLY, JOHNSON e WARNAKULASURIYA, 2001).

A cavidade oral se estende desde os lábios até as pregas palatoglossais. Os tumores podem se localizar nos lábios, na mucosa bucal, na gengiva, no palato duro, nos dois terços anteriores da língua e no soalho bucal. A região com maior susceptibilidade a carcinogênese abrange o soalho bucal e a mucosa lingual adjacente, o sulco sublingual e a região retromolar. Mesmo correspondendo a aproximadamente 20% da cavidade oral, nela se concentram 75% dos carcinomas epidermóides. Essa área tem sido denominada “área de drenagem” uma vez que muitos carcinógenos permanecem ali antes de sua ingestão (BARNES et al., 2005).

A orofaringe equivale a base ou terço posterior da língua, valécua, tonsila com fossa tonsilar e pilares, sulco glossotonsilar, paredes posterior e superior compostas da superfície do palato mole e da úvula. Dentre estes sítios, o primeiro é o mais afetado pelo CE. Tumores nesse sítio podem invadir tecidos adjacentes e têm a tendência de ascender à nasofaringe (BARNES et al., 2005).

As altas taxas de invasão local e o grande potencial metastático apresentadas pelo CEO o caracterizam como tumor de grande agressividade. Desse modo, muitos pacientes vêm a óbito por disseminação local ou regional da doença (OGBUREKE et al., 2007).

A última Estimativa Global de Incidência, Mortalidade e Prevalência do Câncer de 2012, organizada pela *World Health Organization (WHO)*, previu a ocorrência de aproximadamente 300.000 novos casos e 145.000 óbitos por câncer de lábio e cavidade oral. Isso posiciona essas neoplasias entre as 15 mais comuns. As mais altas taxas de incidência foram observadas em populações da Melanésia, do Centro-Sul Asiático, da Austrália e Nova Zelândia, da Europa Oriental, da América do Norte e da Europa Centro-Occidental. Entre os países, as maiores taxas de incidência e mortalidade foram registradas na Índia, nos Estados Unidos, na China, no Paquistão, em Bangladesh e no Brasil (FERLAY et al., 2012). Entre os indianos, aproximadamente 80.000 casos deste tipo de câncer são diagnosticados todo ano (KULKARNI, 2013).

Homens são maioria entre os pacientes, podendo a proporção entre os sexos ultrapassar 10:1 (STEWART; KLEIHUES, 2003). Ainda segundo a *WHO-2012*, para o câncer de lábio e cavidade oral a incidência foi de 2,7% para o sexo masculino e de 1,5% para o sexo oposto. Essa diferença mostrou-se mais acentuada em regiões menos desenvolvidas (3,1% e 1,8%) em relação àquelas mais desenvolvidas (2,1% e 1,2%) (FERLAY et al., 2012). Nos últimos anos tem sido relatada uma tendência de queda nos índices de mortalidade por câncer oral em muitos grupos masculinos, o que não se verifica nas populações femininas estudadas (INCA, 2014).

Recentemente tem-se verificado um aumento na incidência do câncer de cavidade oral e orofaringe entre adultos jovens (com menos de 45 anos) de países ocidentais.

Estudos apontam que 4-6% dos tumores orais acometem indivíduos com menos de 40 anos (ANNERTZ et al., 2002; SCHANTZ e YU, 2002).

Dados do *WHO*-2012 também mostraram que o índice de mortalidade foi inversamente proporcional ao grau de desenvolvimento humano. Menores percentuais (1%) foram verificados em regiões com nível de desenvolvimento humano muito alto, ao passo que esse valor aumenta tratando-se de áreas com alto (1,6%), médio (2,0%) e baixo (3,3%) padrão (FERLAY et al., 2012).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2014, a estimativa de incidência para cavidade oral é de 11,54% entre os homens e 3,92% nas mulheres. Prevê-se ainda o surgimento de 15.290 novos casos, sendo 11.280 para o sexo masculino. Entre os homens esse tipo de lesão é o quinto mais comum no país (INCA, 2014).

Na região Sudeste é o quarto mais frequente entre homens (15,48/ 100 mil habitantes) e o nono entre as mulheres (4,88/ 100 mil) (INCA, 2014). Uma pesquisa realizada em São Paulo, Curitiba e Goiânia encontrou 83,2% dos casos de CE bucal em brancos, 11,2% em mulatos e 4,3% em negros (FRANCO et al, 1989). Entre os pacientes examinados em Belo Horizonte, 33,5% eram negros, 23,7% brancos e 42,8% mulatos (GERVÁSIO et al., 2001).

O Espírito Santo figura entre os estados brasileiros de maior incidência de câncer oral. Há previsão de 400 novos casos, sendo 290 entre homens e 110 entre as mulheres. Para a capital Vitória são estimadas 30 novas ocorrências (INCA, 2014). Entre os pacientes capixabas, segundo dados publicados em 2010, há predomínio do sexo masculino (80,4%), cor branca (52,2%), com média de idade de 57,7 anos. A língua foi o sítio mais frequente do tumor primário (41,3%) (GOUVEA et al., 2010).

2.1.2 FATORES DE RISCO

Ao longo das últimas décadas, fatores como o tabagismo, o etilismo, entre outros têm sido estabelecidos como influentes no desenvolvimento do carcinoma

epidermoide oral (CEO). Recentemente, a infecção por HPV tem ganhado destaque como fator de risco adicional especialmente nos casos de orofaringe em indivíduos mais jovens e sem histórico de tabagismo ou etilismo (RAGIN, MODUGNO e GOLLIN, 2007; STADLER et al., 2008).

O perfil tradicional do paciente com CEO é homem oriundo de classes menos abastadas, com mais de 50 anos, fumante e etilista crônico. A predominância do sexo masculino entre os pacientes relaciona-se ao fato de o consumo de álcool e tabaco ser comumente um hábito vinculado ao homem. Entretanto, essa não parece ser uma forte tendência entre os pacientes mais jovens. A disparidade comumente observada entre os sexos está se tornando menos acentuada com a maior aceitação social do consumo de cigarro e álcool por mulheres (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001). Dados de Llewellyn et al. (2003) envolvendo pacientes com idade igual ou inferior a 45 anos, demonstraram que 25% deles não tinham histórico de uso de álcool ou tabaco. Dentre estes, a maioria era do sexo feminino (RAGIN, MODUGNO e GOLLIN, 2007; WISEMAN et al., 2003).

Tradicionalmente, o tabagismo e o etilismo são os principais fatores de risco, havendo grande sinergismo e efeito dose-dependente entre eles, independentemente da idade. Fumantes e etilistas têm alta probabilidade de desenvolver um segundo câncer primário em relação àqueles pacientes que não fazem uso dessas substâncias (MASSANO et al., 2006). Embora existam variações geográficas, tendo em vista dos padrões socio-culturais de consumo, o efeito combinado da exposição a ambos é responsável por aproximadamente 70% dos casos de câncer de cabeça e pescoço em todo o mundo. Para o câncer de cavidade oral a proporção chega a 65% (BOYLE; LEVIN, 2008).

O tabagismo, associado ou não ao alcoolismo, é o maior fator de risco para o câncer oral. Fumantes são de 5 a 7 vezes mais suscetíveis que os não-fumantes (KULKARNI, 2013). Há elevado perigo para fumantes pesados (que usam mais de dois maços por dia), fumantes de longa data e para os que fazem uso de fumo (*black tobacco*) ou cigarros com alto conteúdo de alcatrão. A interrupção no consumo tem como efeito a diminuição do risco (BOYLE e LEVIN, 2008; FRANCO et al, 1989).

Nos países ocidentais o uso de cigarros e a ingestão abusiva de álcool são as formas mais comuns de exposição aos fatores de risco. Já na Índia e em outras nações do Sudeste Asiático, as variadas formas de consumo do tabaco sem combustão são extremamente prevalentes. Essas modalidades, que incluem o hábito de mascá-lo, tem sido associadas ao aumento do risco e a incidência particularmente alta do carcinoma epidermoide oral (WINN, 1997).

Todas as formas de utilização do tabaco, seja fumado (cigarros, charutos, cachimbos, cigarro de palha), mascado (fumo de rolo) ou inalado (rapé) têm efeito no incremento das probabilidades de desenvolvimento do câncer oral. Segundo o Departamento de Saúde dos Estados Unidos, a não exposição à fumaça do tabaco não torna seu consumo sob outras formas mais seguro (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007). Até então, 28 carcinógenos foram identificados nos derivados consumidos sem combustão. Dentre estes tem-se as *N*-nitrosaminas tabaco específicas derivadas de alcalóides não voláteis (TSNA) e os ácidos *N*-nitrosamínicos como grupos mais abundantes (WHO, 2007). Já na fumaça de cigarro já foram contabilizadas mais de 70 substâncias capazes de iniciar ou promover o câncer, como o arsênico, o benzeno, os hidrocarbonetos policíclicos e as nitrosaminas específicas do tabaco (WHO, 2002).

As lesões ao DNA são principalmente fruto de danos oxidativos. O benzo- α -pireno diol epóxido (BPDE) é capaz de formar adutos de DNA covalentemente ligados por todo o genoma, incluindo o gene *TP53* (*tumor protein 53*) (DENISSENKO et al., 1996). Dentre as nitrosaminas específicas do tabaco capazes de formar adutos estão a dimetilnitrosamina (DMN), a *N*'-nitrosonornicotina (NNN) e a 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) (CHRISTMANN E KAINA, 2012).

Adicionalmente, a exposição repetida ao calor resultante da combustão do cigarro promove agressões à mucosa bucal. Estas, ainda que passageiras, otimizam o contato mais direto com as substâncias tóxicas e contribuem para a gênese de lesões mais graves (INCA, 2002).

No Brasil as regiões com as maiores taxas de prevalência de tabagismo, Sudeste e Sul, são também as que possuem as mais altas incidências de câncer na cavidade oral (WÜNSCH FILHO et al., 2010).

O consumo crônico de álcool é capaz de elevar significativamente o risco de neoplasias da região oral em relação àqueles indivíduos que bebem apenas eventualmente (SOARES, 2007). Estudos cuja intenção era verificar a diferença entre o consumo de cerveja, vinho e licor observaram aumento no risco frente ao consumo excessivo de quaisquer bebidas alcoólicas, num padrão dose-resposta (BARNES et al., 2005). Desse modo, a quantidade total de álcool ingerida e a duração do uso seriam aspectos mais relevantes do que o tipo de bebida consumida. De qualquer modo, a análise da relação ingestão de álcool/câncer oral é complexa, dada a dificuldade de padronização dos dados coletados. Os pacientes costumam assimilar diferentes graduações alcoólicas e, à nível de entrevista, têm dúvida ao informar sobre as doses consumidas, o que torna imprecisas as informações obtidas (CARRARD et al., 2008).

Não há pleno conhecimento acerca da atuação do etanol na geração do carcinoma, tendo em vista que a substância em si não é considerada carcinogênica para humanos.

Sabe-se que álcool pode atuar como solvente e otimizar a absorção de compostos cancerígenos do tabaco pela mucosa oral, o que pode estar associado ao sinergismo verificado entre os dois principais fatores de risco (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001). Concentrações de etanol entre 15 e 25% seriam capazes de atrapalhar a formação da barreira de permeabilidade pelas células epiteliais, facilitando a penetração de substâncias (CARRARD et al., 2008).

Embora a maior parte do etanol seja metabolizada no fígado, uma fração dele é assimilada e degradada a nível do epitélio oral. Na via de oxidação sequencial há a transformação do álcool em acetaldeído (pela enzima álcool-desidrogenase - ADH) e deste em acetato (pela ação da enzima aldeídodesidrogenase - ALDH). Sendo a ação da ALDH diminuída na boca e havendo consumo contínuo de altas doses de bebida alcólica, é possível o acúmulo do acetaldeído que tem efeito carcinogênico em células animais (BOYLE e LEVIN, 2008; GIGLIOTTI et al., 2008). Esse metabólito é capaz de gerar ruptura da dupla fita do DNA, além de constituir complexos (aductos) com proteínas (CARRARD et al., 2008). Polimorfismos nos genes codificantes de ADH e ALDH podem influenciar na capacidade individual de

metabolização, conferindo assim maior ou menor susceptibilidade aos efeitos derivados do consumo de bebidas alcoólicas.

No mais, o álcool também é capaz de desencadear deficiências nutricionais, como da vitamina A e alterações no sistema imunológico (CARRARD et al., 2008).

A infecção por HPV (Papilomavírus Humano) tem sido relatada como um fator de risco especialmente para aqueles tumores de orofaringe, em detrimento de outros sítios da região de cabeça e pescoço (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007). A incidência desse tipo de caso tem aumentado nos Estados Unidos e no norte da Europa (RAMQVIST; DALIANIS, 2010). Pacientes com câncer de orofaringe positivos para HPV costumam ser mais jovens e não ter histórico de uso de álcool e tabaco (STADLER et al., 2008). Esse fenômeno tem sido associado a prática de sexo oral e a mudanças comportamento, como o início precoce da vida sexual e o relacionamento com múltiplos parceiros (INCA, 2014; SCHWARTZ et al., 1998). Cerca de 85 a 90% das infecções estão associadas ao subtipo viral 16, que é também o mais comum entre as neoplasias genitais (ARRESE; LAZARUS, 2013).

Ragin, Modugno e Gollin (2007) afirmam que, no caso de CECP, o vírus não é transcricionalmente ativo em todos os casos. Apenas 11 - 50% apresentam a síntese das proteínas oncogênicas, conhecidas como E6 e E7. Nos demais casos, embora o DNA viral seja detectável, a ausência de patogenicidade indica que a infecção por HPV não tenha relação com o desenvolvimento tumoral.

No Brasil, estudos com CEO têm mostrado baixa prevalência de HPV (<10%), incluindo tumores de cavidade oral e orofaringe (CORDEIRO-SILVA et al., 2012). No caso de Rivero e Nunes (2006), nenhuma amostra apresentou amplificação do DNA viral.

Quanto a relevância da raça, estudos americanos apontam que caucasianos têm diagnóstico e prognóstico mais favoráveis em relação àqueles com ascendência africana. A explicação residiria nas disparidades em relação ao acesso aos serviços de saúde e ao estágio na ocasião do diagnóstico (WORSHAM, M. J. et al., 2012).

A influência das condições socioeconômicas residiria na dificuldade de acesso à serviços médicos e na deficiente higiene bucal (MASSANO et al, 2006). A má

higiene favoreceria o acúmulo microbiano que por sua vez promoveria aumento na produção do acetaldeído. Organismos como **Candida albicans** possuem alta atividade da enzima ADH e são mais comuns e abundantes na microbiota bucal de indivíduos etilistas (HOMANN, N. et al., 2001). Ainda tratando de condições bucais, o uso de próteses mal-ajustadas ou que por outros motivos lesionem o tecido adjacente, também constitui-se como condicionante de risco (INCA, 2002).

Pacientes com câncer oral costumam ter dieta deficiente em vegetais e frutas. Uma alimentação preventiva incluiria frutas cítricas, peixes e óleos vegetais. Substâncias como o betacaroteno e as vitaminas C e E seriam importantes devido ao seu potencial antioxidante (MCLAUGHLIN et al., 1988). Já o consumo de carne e pimenta vermelha em pó seria desaconselhável (MEHROTRA; YADAV, 2006).

Tendo em vista que somente uma parcela dos indivíduos expostos aos fatores de risco desenvolvem o carcinoma epidermoide, acredita-se que a susceptibilidade genética e o histórico familiar tenham importância no desenvolvimento da doença. Alguns pacientes possuem capacidade reduzida de reparo a danos provocados por substâncias do tabaco, tal como o benzo- α -pireno diol epóxido. Isso indica uma maior susceptibilidade a danos cromossomais desencadeados por carcinógenos (MEHROTRA; YADAV, 2006). O início precoce do tumor, antes dos 45 anos, costuma ser um indicador de câncer hereditário, com alto risco do mesmo tipo de neoplasia para parentes de primeiro grau (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001).

Indivíduos com resposta imonológica limitada podem ser predispostos. Dados de Harris e Penn (2001) indicam que o carcinoma epidermoide (CE) de lábio é mais frequente em pacientes transplantados recebendo terapia imunossupressora em relação a população geral. Ainda segundo este estudo, a infecção por HIV não predispõe ao CE intra-oral.

A exposição contínua a radiação solar tem estreita relação com o câncer labial, tendo em vista que favorece o desenvolvimento de lesões cancerizáveis (queilite actínica) que podem evoluir para o carcinoma epidermoide (DOBROSSY, 2005).

2.1.3 SINTOMAS, DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO

A despeito dos avanços nas áreas de oncologia e cirurgia e do desenvolvimento de tratamentos e equipamentos médicos modernos, CEO continua associado a alta incidência e mortalidade, bem como a prognósticos desfavoráveis (MOON et al, 2013).

Pacientes com pequenas lesões CEO são geralmente assintomáticos ou têm sintomas vagos e sinais anatômicos mínimos. Aqueles com a doença localmente avançada possuem características clínicas que variam segundo o local afetado. Crescimento e ulceração da mucosa, dor, dor atribuída ao ouvido, mal hálito, dificuldade de falar, abrir a boca, mastigar, deglutição dolorida e dificultosa, sangramento, perda de peso e inchaço do pescoço são sinais comuns nessa situação (BARNES et al., 2005).

Tumores muito avançados exibem crescimento ulceroproliferativo com zonas de necrose e ampliação para estruturas próximas como ossos, músculos e pele. Os pacientes em fase terminal podem apresentar fístula orocutânea, sangramento intratável, anemia severa e caquexia (condição de anorexia, perda de peso involuntária, perda de massa muscular, alterações no paladar, fraqueza e atrofia dos órgãos viscerais) (BARNES et al., 2005).

O diagnóstico adequado, com a análise do tumor primário e sua extensão clínica, é essencial para o bom desenvolvimento da terapia e para a sobrevivência do paciente. De maneira geral, o exame físico abrange a avaliação visual, a palpação das superfícies mucosas e do soalho bucal e a inspeção do pescoço para envolvimento linfonodal. O diagnóstico é confirmado pelo exame histopatológico do material obtido por biópsia. Endoscopia, radiografias simples e panorâmica, tomografia computadorizada e ressonância magnética podem ser utilizados para melhor avaliar a extensão da doença (BARNES et al., 2005).

O estadiamento é feito segundo o sistema TNM (*tumor-node-metastasis*) que baseia-se em três parâmetros: a extensão/tamanho do tumor primário (T), a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos (N) e a presença ou ausência de metástases distantes (M). As tabelas a seguir mostram os critérios

adotados na avaliação de cada parâmetro (Tabela 1) e como estes são agrupados para definição do estágio da doença, que varia de 0 à IV (Tabela 2).

Tabela 1: Critérios de avaliação dos parâmetros do sistema TNM para CEO.

T - Tamanho do tumor primário	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão.
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão.
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão.
T4	T4a (Lábio) - Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz);
	T4a (Cavidade oral) - Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face;
	T4a (Orofaringe) - Tumor que invade qualquer das seguintes estruturas: laringe, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), pterigóide medial, palato duro e mandíbula;
	T4b (Lábio e cavidade oral) - Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna;
	T4b (Orofaringe) - Tumor que invade qualquer das seguintes estruturas: músculo pterigóide lateral, lâminas pterigóides, nasofaringe lateral, base do crânio ou adjacentes a artéria carótida.
N – Linfonodos Regionais	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão.
N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão.
	N2a - Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão;
	N2b - Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão;
	N2c - Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão.
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão.
M – Metástases distantes	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

Fonte: INCA (2004).

Tabela 2: Agrupamento por Estádios segundo a classificação TNM.

Estádio		Classificação TNM		
		T	N	M
0		Tis	N0	M0
I		T1	N0	M0
II		T2	N0	M0
III		T1, T2	N1	M0
		T3	N0, N1	M0
IV	IVA	T1, T2, T3	N2	M0
		T4a	N0, N1, N2	M0
	IVB	Qualquer T	N3	M0
		T4b	Qualquer N	M0
	IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: INCA (2004).

Há dois tipos de estadiamento: o clínico (cTNM) e o patológico (pTNM). O primeiro, feito antes do tratamento, é estabelecido com base em exame físico, diagnóstico por imagem, endoscopia, biópsia, exploração cirúrgica e outros exames relevantes. É usado na definição da terapia e para reportar os resultados do tratamento. O segundo é proposto a partir das informações do cTNM suplementadas ou modificadas por dados extras obtidos através da cirurgia e do exame histopatológico. É utilizado como critério na escolha da terapia pós-operatória complementar e na elaboração do prognóstico (INCA, 2004).

O estadiamento na ocasião do diagnóstico pode variar sob influência de questões socio-econômicas e regionais. Como a maioria dos pacientes são oriundos de classes sociais menos favorecidas economicamente, o acesso aos serviços de saúde e cuidados especializados pode ser comprometido (ADRIEN et al., 2013). Na Índia 60-80% dos pacientes se apresentam com o estágio avançado ao passo que em países desenvolvidos esse valor é de 40% (KULKARNI, 2013).

Um terço dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço são atendidos nos estágios precoces (estágios I ou II) da doença e podem ser curados com cirurgia e/ou radioterapia, sem maiores sequelas. Entretanto, a maioria é diagnosticada já com lesões avançadas (estágios III e IV), tendo assim prognóstico mais severo (FARIA et al., 2003). Nesses pacientes há alto risco de recorrência, metástase frequente e o surgimento de um segundo tumor primário principalmente no trato

aerodigestivo superior (HEROIU; DANCIU; POPESCU, 2013). A taxa de mortalidade chega a ser superior a 60% (GIGLIOTTI et al., 2008; MASSANO et al., 2006)

O prognóstico do CEO tem sido amplamente ligado ao seu estadiamento. Tradicionalmente, quanto maior o estágio TNM, pior o prognóstico (BRENER et al., 2007). Entretanto, certos pacientes vêm a falecer ainda que classificados nos estágios precoces da doença (ALVES et al., 2011). Comumente, as informações do estadiamento são complementadas pela avaliação histopatológica. Porém, o grau de diferenciação histológica tem fraca relação com o prognóstico de CEO, resultando em indicadores preditivos insatisfatórios (INCA, 2001; MASSANO et al., 2006).

Pacientes com metástase linfonodal costumam ter índice de sobrevida muito menor do que aqueles sem anormalidades nos linfonodos. Sua detecção está vinculada com a diminuição da sobrevida global para cerca 50% dos pacientes, assim como com maiores taxas de recorrência (SANDERSON; IRONSIDE, 2002). O envolvimento linfonodal pode ser classificado como evidente/clínico ou não-evidente/oculto. Neste último caso, um complicador é que os pacientes não apresentam indícios clínicos ou radiológicos de disseminação que é detectável somente após imunohistoquímica ou análise molecular dos linfonodos dissecados (FERLITO et al, 2003).

O sítio anatômico pode estar relacionado à evolução tumoral e prognóstico, tendo em vista sua maior ou menor abundância de vasos sanguíneos e linfáticos. Carcinomas epidermóides metastáticos têm sido mais observados na base do que na porção oral da língua (GENDEN et al., 2003). Locais como o sulco gengivolabial superior além de possuírem vasta rede linfática, são de difícil avaliação quanto a extensão local, o que também contribui para um prognóstico desfavorável (TIWARI, 2000).

De acordo com Massano et al. (2006), pacientes com CEO que apresentam simultaneamente outras enfermidades como arritmias, doenças pulmonares e renais ou outros tipos de câncer, possuem baixa taxa de sobrevida com ou sem tratamento. A condição do sistema imune também é influente em termos de sobrevida, havendo associação entre menor taxa de sobrevida em 5 anos em pacientes com CEO e indícios de imunodepressão.

A modalidade de tratamento é escolhida de acordo com o estágio clínico do paciente, podendo ser cirúrgica, radioterápica ou ambas. A quimioterapia é geralmente requerida em situações particulares (INCA, 2001).

A adoção da cirurgia ou da radioterapia demonstra bons resultados para lesões iniciais, limitadas ao sítio de origem e sem extensão a tecidos adjacentes. O índice de cura chega a 80% dos pacientes. Havendo possibilidade, a ressecção também é indicada para os demais casos, combinada ou não à radioterapia (INCA, 2002). O procedimento cirúrgico deve abranger todo o tumor primário e bordas de tecido saudável circundante. O tratamento radioterápico de lesões extensas deve atingir as cadeias de drenagem linfática ainda que não comprometidas clinicamente (INCA, 2001).

Nos casos de doença mais avançada, a administração da quimioterapia objetiva a diminuição do tumor para posterior intervenção das outras duas terapias. Recomenda-se o acompanhamento pós-cirúrgico dos pacientes em estágio IV por uma equipe multidisciplinar integrada por fisioterapeuta, fonoaudiólogo e psicólogo. Nestes casos, embora as técnicas de reconstrução tenham evoluído, as deformidades ainda são grandes (INCA, 2001).

2.2 A Metilação como Evento Epigenético

O termo epigenética se refere a mudanças estáveis na expressão gênica resultantes de alterações na cromatina que não afetam a sequência nucleotídica, sendo herdáveis durante a divisão celular (FAKHR, et al., 2013).

Dois dos mecanismos epigenéticos existentes em células eucarióticas são a modificação de histonas e a metilação do DNA. Ambos derivam do fato de o enovelamento da cromatina afetar diretamente a expressão dos genes, sendo capazes de alterar a acessibilidade dos complexos proteicos de transcrição, replicação e reparo do DNA (WOODCOCK, 2006). De modo geral, maior condensação está relacionada ao silenciamento gênico ao passo que uma menor condensação tem efeito na ativação da transcrição.

Os nucleossomos, unidades básicas da cromatina, são compostos pelo octâmero de histonas (proteínas H2A, H2B, H3 e H4, todas com 2 cópias) envolto por 146 pares de base (KORNBERG; LORCH, 1999). Cada histona possui uma cauda aminoterminal (N-terminal) livre para sofrer modificações tais como metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação, a maioria delas ainda pouco caracterizada. Sabe-se, entretanto, que as duas primeiras influenciam a regulação transcricional. Modificações das histonas H3 e H4 de nucleossomos localizados na região promotora e porções transcritas podem ou não facilitar a interação da maquinaria de transcrição com o DNA (HIRST; MARRA, 2009).

De modo geral, a acetilação de histonas é associada a ativação da transcrição. A acetilação do aminoácido lisina é capaz de neutralizar a carga positiva das histonas e portanto diminuir sua interação com a molécula de DNA, negativamente carregada. Desse modo, há melhor acessibilidade à cromatina e maior atividade transcricional (GREGORY et al., 2001). Esse tipo de modificação é realizado pelas proteínas histona acetiltransferases (HATs), cuja ação é antagonizada pelas histona desacetilases (HDACs) que removem o grupo acetil, como mostrado na Figura 1 a seguir.

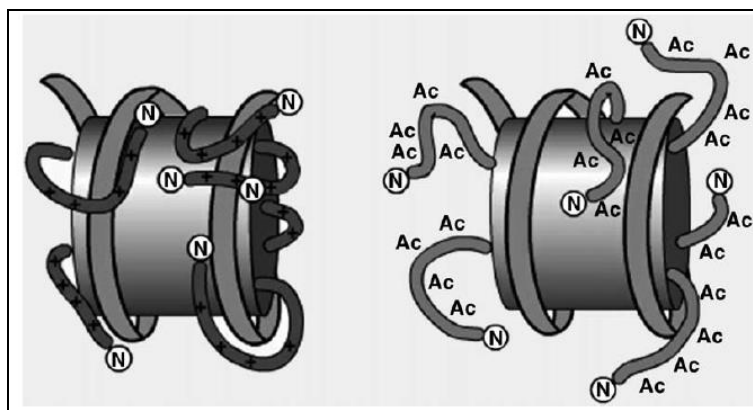


Figura 1: Efeito da acetilação de histonas no enovelamento da cromatina. À esquerda, as cargas positivas das histonas melhoram sua interação com a molécula de DNA negativamente carregada. Como resultado tem-se uma cromatina mais condensada, o que dificulta a transcrição. À direita, a acetilação das lisinas presentes nas caudas N-terminais neutraliza a positividade das histonas, reduzindo sua interação com o DNA. Dessa maneira, a transcrição é facilitada. Da esquerda para a direita haveria a atuação das histona acetiltransferases (HATs). O inverso seria promovido pelas histona desacetilases (HDACs).

Fonte: Shaw (2006).

Já a metilação deste mesmo aminoácido mostra-se um evento complexo cujos resultados dependem de qual resíduo é alterado e do contexto gênico em que a

histona se encontra. Como exemplo, a metilação da lisina 4 de H3 tem efeito ativador ao passo que a metilação das lisinas 9 ou 27 da mesma histona tem ação repressora (KRISTENSEN; NIELSEN; HANSEN, 2009).

A metilação do DNA é o evento epigenético mais bem estudado, com grande relevância no desenvolvimento embrionário, na regulação da transcrição, na inativação do cromossomo X e no *imprinting* genômico. Modificações nos padrões de metilação podem ser letais durante o desenvolvimento e estão também associados a uma série de doenças, como o câncer (HIRST; MARRA, 2009).

A metilação, que consiste na adição de um grupo metil à base citosina, é executada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) usando a S-adenosilmetionina (SAM) como doadora do radical metil, como ilustrado na Figura 2.

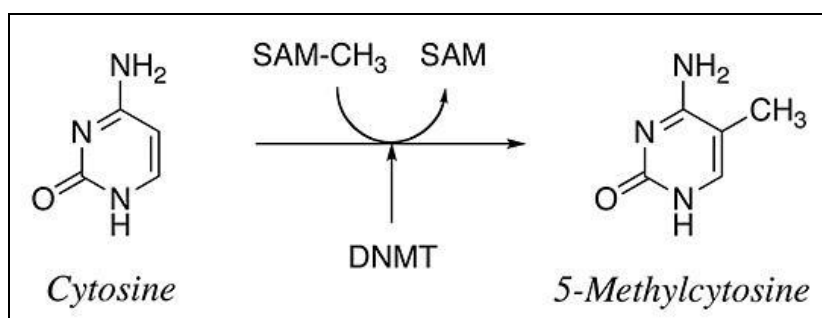


Figura 2: Conversão de uma base citosina para 5-metilcitosina por uma DNA metiltransferase (DNMT). A metilação do DNA ocorre pela transferência do grupo metil do aminoácido S-adenosilmetionina para o carbono 5 da citosina, catalizada pela enzima DNMT.
Fonte: Fakhr et al. (2013).

Sabe-se que nas células de mamíferos há três delas: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. O perfil primário é determinado durante o desenvolvimento embrionário pela ação da DNMT3A e da DNMT3B, capazes de realizar a metilação *de novo*, ou seja, gerar novos pontos de metilação quando nenhuma das fitas simples apresenta modificação (DAS; SINGAL, 2004). A DNMT3A também é ativa em gametas maduros (FAKHR et al., 2013). Já a DNMT1 tanto realiza reações *de novo* quanto mantém os padrões de metilação durante a replicação. Neste último caso, a fita recém-sintetizada é metilada com base na presença de dessa modificação na fita-molde complementar (HIRST; MARRA, 2009). Dessa maneira é possível entender como os padrões são conservados ao longo da vida de um organismo e como as mudanças ocasionadas por fatores ambientais são propagadas através da divisão

celular. Entretanto, a transmissão de pais para filhos é dificultada por uma onda de desmetilação que ocorre logo no início da vida embrionária (MORGAN et al., 2005). Após a fecundação e as primeiras divisões (entre o zigoto e o estágio de 8 células), ocorre a desmetilação do DNA parental seguida pela metilação *de novo* (entre os estágios de mórula e blastocisto) (CLARK; MELKI, 2002).

Em mamíferos, a metilação do DNA ocorre basicamente em citosinas que precedem guaninas, locais estes denominados dinucleotídeos CG ou sítios CpG, cuja distribuição no genoma humano não é aleatória (DAS; SINGAL, 2004). Há as chamadas ilhas CpG, zonas ricas em CG variando de 0,5 a 5 kilobases (kb), localizadas na região promotora ou nos primeiros exons de 40 - 60% dos genes (KRISTENSEN; NIELSEN; HANSEN, 2009). Estima-se a existência de cerca de 45.000 ilhas por todo o genoma, não necessariamente metiladas. Em células normais, cerca de 94% delas permanecem desmetiladas e são associadas à genes transcritionalmente ativos, sejam constitutivos ou tecido-específicos (HIRST; MARRA, 2009). Aquelas com metilação correspondem a regiões de inatividade gênica. Raros fora das ilhas, de 70 - 80% dos dinucleotídeos CpG dispersos pelo genoma apresentam metilação (BIRD, 1992). O DNA repetitivo, que compreende mais de 35% do genoma, também é geralmente metilado (CLARK; MELKI, 2002). A Figura 3 abaixo representa de maneira genérica o padrão de metilação esperado para células normais.

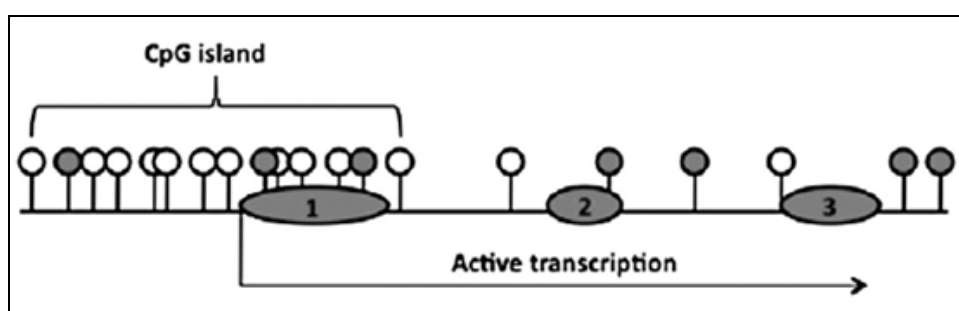


Figura 3: Padrão de metilação do DNA em células normais. Os sítios CG (representados por círculos) de ilhas CpG costumam ser desmetilados (círculos brancos) ao passo que aqueles dispersos pelo genoma tendem a apresentar metilação (círculos cinzas). Ilhas CpG geralmente se localizam no interior da região promotora ou na proximidade dos primeiros exons (numerados de 1 a 3). Ilhas desmetiladas associam-se à transcrição ativa.

Fonte: Kristensen, Nielsen e Hansen (2009).

Embora a maioria das ilhas CpG permaneça desmetilada, as células normais têm algumas particularidades em relação à metilação. No caso de *imprinting* genômico, a metilação restrita a apenas um dos dois alelos parentais é responsável pela expressão monoalélica (FALLS et al., 1999). A metilação também é responsável pela inativação completa de um dos cromossomos X em mulheres e de genes da linhagem germinativa na maioria dos tipos celulares (KRISTENSEN; NIELSEN; HANSEN, 2009). Já a metilação em regiões repetitivas, como DNA satélite, LINEs/SINEs e retrovírus endógenos tende a bloquear sua transcrição e impedir uma consequente mutagênese insercional (BIRD, 1992).

O padrão normal e tecido-específico de metilação pode sofrer alterações influenciadas pela idade, pela dieta e pela exposição a fatores ambientais. Gêmeos monozigóticos jovens tendem a ser mais epigeneticamente semelhantes do que quando adultos. Com o passar dos anos, ilhas CpG tendem a ganhar pontos de metilação ao passo que sítios CpG fora das ilhas costumam perder essa modificação (CHRISTENSEN et al., 2009).

Existem algumas propostas relativas aos mecanismos pelos quais a metilação do DNA participa da regulação da expressão gênica. Um deles seria que a própria presença do grupo metil ligado à citosina poderia dificultar a ligação de fatores de transcrição aos seus sítios de reconhecimento. Alguns fatores como AP-2, CREB dependente de AMPc, E2F e NFkB, que se unem a sequências portadoras de sítios CpG, teriam sua ação inibida na ocorrência de metilação (TATE; BIRD, 1993).

Outro mecanismo, segundo Das e Singal (2004), seria a ligação de repressores da transcrição às sequências metiladas, onde as citosinas atuariam como “pontos de referência” para a desacetilação de certos resíduos. As proteínas MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 e Kaiso são conhecidas por sua capacidade de união a sítios metilados. Todas o fazem por meio de sua região MBD (*methyl CpG binding domain*), exceto Kaiso que o faz através de dedos de zinco. Três delas (MeCP2, MBD2, and MBD3) estão contidas em complexos (MeCP-2, MeCP-1 and Mi-2, respectivamente) que incluem HDACs. Essas removeriam os grupos acetil das histonas, fazendo com que cromatina assumisse uma conformação desfavorável à instalação do maquinário transcricional. De acordo com Kristensen, Nielsen e Hansen (2009), as DNA metiltransferases DNMT1, DNMT3A e 3B também teriam

papel inibidor na transcrição também por sua interação com certas HDACs. Por outro lado, aquelas histonas anexas a ilhas CpG não metiladas seriam acetiladas pelas HATs, favorecendo assim a expressão gênica. A Figura 4 esclarece como a metilação poderia interagir com outros eventos epigenéticos na regulação da transcrição.

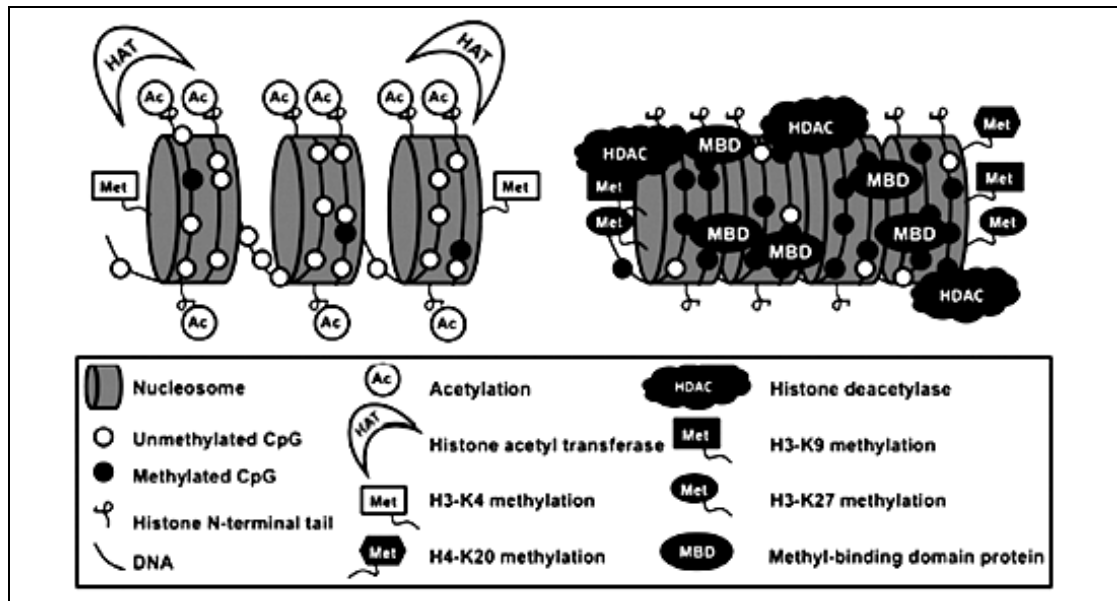


Figura 4: A metilação e outras alterações epigenéticas e sua influência na regulação da expressão gênica. À direita, uma região promotora de um gene ativo: ilha CpG desmetilada em associação com a acetilação de histonas, promovida pela histona acetiltransferase (HAT), favorece uma conformação mais acessível aos fatores de transcrição. À esquerda, o silenciamento gênico via epigenética: os sítios CpG metilados recrutam proteínas MBD (*methyl CpG binding domain*) e histonas desacetilases (HDACs), que executam a remoção dos grupos acetil das histonas adjacentes. Como resultado, a região promotora e as regiões codificantes tornam-se inacessíveis à maquinaria de transcrição. Fonte: Kristensen, Nielsen e Hansen (2009).

2.3 A Metilação e o Câncer

Alterações no perfil de metilação, estabelecido durante a diferenciação celular, estão relacionadas ao desenvolvimento do câncer, podendo ser efetivas na distinção entre tecidos normais e tumorais (CORDEIRO-SILVA et al, 2011). Sabe-se que células derivadas de tumores e de lesões pré-malignas apresentam maiores e mais frequentes taxas de metilação em relação às suas correspondentes normais e tecidos saudáveis (PIYATHILAKE et al, 2005).

Existem dois tipos de desarranjos que acompanham a progressão do câncer: o primeiro seria a diminuição geral da quantidade de citosinas metiladas no genoma, chamada hipometilação; o segundo seria o incremento da metilação das ilhas CpG associadas aos promotores gênicos, conhecida como hipermetilação. A hipometilação é associada à instabilidade do DNA e à ativação de genes, especialmente oncogenes. Já a hipermetilação está ligada ao silenciamento de genes supressores de tumor e de reparo do DNA.

Mesmo sendo a primeira alteração epigenética descrita para o câncer, a função da hipometilação na carcinogênese não está plenamente elucidada. Poderia ser determinante em alguns casos e apenas influente em outros. O grau de hipometilação tende a aumentar a medida em que lesões benignas evoluem para tumores invasivos (FRAGA et al., 2004). Células malignas apresentam uma redução de 20 - 60% na metilação do DNA em relação às normais (ESTELLER, 2005). Essa diferença resulta principalmente da desmetilação de sequências repetitivas, regiões codificantes e íntrons. Dessa maneira, a evolução do tumor poderia ser favorecida por meio da perda do *imprinting* (SAKATANI et al., 2005), da geração de instabilidade cromossômica (EDEN et al., 2003), da reativação de retrotransposons (WALSH et al., 1998) e da ativação de oncogenes, tais como *HRAS*, e outros genes envolvidos na carcinogênese (FEINBERG, 1983; NAKAYAMA et al., 1998; NISHIGAKI et al., 2005).

O silenciamento de genes associado à hipermetilação tem sido considerado um dos maiores eventos na origem do câncer. O gene *Rb*, no retinoblastoma, foi o primeiro supressor de tumor cuja perda de expressão foi descrita como resultado da hipermetilação de seu promotor (GREGER et al., 1989). Após este, o silenciamento via metilação foi registrado em outros tipos de tumores para genes relacionados ao controle do ciclo celular, ao reparo do DNA, à apoptose, à adesão celular, à desintoxicação, à diferenciação, à angiogênese e à metástase (DAS; SINGAL, 2004).

Ao passo que existem genes cuja hipermetilação é verificada em diversos tipos de câncer, como o *CDKN2A*, há outros que mostram um perfil mais específico, como gene *VHL* em células renais. Além disso, vários genes podem apresentar hipermetilação em um mesmo tipo de câncer. Um estudo envolvendo câncer de

pulmão revelou os genes *RAR β* , *RASSF1A*, *CDNK2A*, *CHD13* e *APC* como os mais comumente metilados (TSOU et al., 2002).

Cada tipo de tumor pode ter seu conjunto particular de genes hipermetilados. Sendo assim, todo tumor seria potencialmente classificável ou tipificável de acordo com seu perfil de metilação. Esse perfil tenderia a ser aleatório em vista de uma desregulação global dos padrões de metilação ou da maquinaria protetiva. Entretanto, a supressão de genes específicos em diferentes tipos celulares resultaria em sequências mais susceptíveis à metilação *de novo*, sobretudo em células cancerosas onde a atividade das DNMTs apresenta-se elevada (CLARK; MELKI, 2002).

2.4 A Hipermetilação e o Carcinoma Epidermoide Oral

A progressão do CEO abrange anormalidades genéticas e epigenéticas possivelmente desencadeadas por fatores de risco, como o consumo de álcool e tabaco (Figura 5). Ambos teriam um impacto direto na regulação da expressão gênica via epigenética, sendo a hipermetilação o mecanismo responsável pela repressão transcricional, logo nas etapas iniciais da tumorigênese. Pacientes com consumo pesado de álcool têm maior chance de apresentar silenciamento via hipermetilação para diversos genes relacionados ao CEO, sendo a inflamação crônica da mucosa oral um potencial fator de risco (GASCHE et al, 2011; GASCHE e GOEL, 2012). A presença de hipermetilação em displasias, leucoplasias e em tecidos adjacentes ao tumor de pacientes CEO reforça o caráter precoce desse tipo de alteração (CORDEIRO-SILVA et al, 2011).

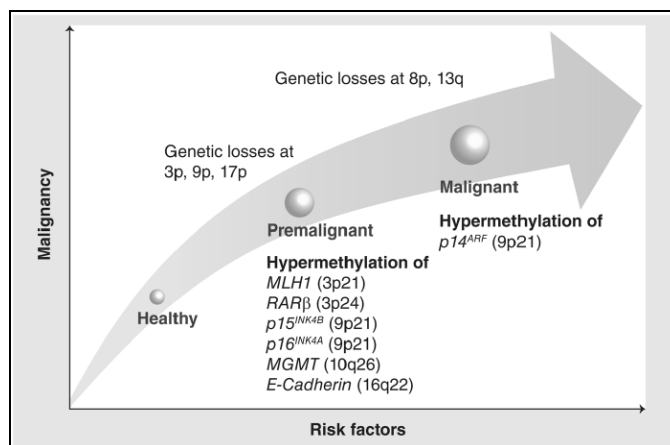


Figura 5: Algumas das alterações genéticas e epigenéticas que acompanham o desenvolvimento do CEO. O surgimento de lesões pré-malignas a partir do tecido saudável e a evolução destas para tumores malignos compreendem aberrações cromossômiais e hipermetilações gene-específicas. Fonte: Gasche e Goel (2012).

Como mostrado na Tabela 3, a metilação de ilhas CpG de diversos genes em tumores de CEO tem sido estudada.

Nos últimos anos, pesquisas têm ambicionado correlacionar características clinicopatológicas à hipermetilação de genes específicos. O objetivo seria definir biomarcadores e propiciar novas abordagens do CEO a medida em que fosse possível prever o comportamento clínico do tumor, haja vista o caso dos genes *CDKN2A* e *CDH1*.

O gene *CDKN2A*, que codifica a proteína p16, atua como inibidor do ciclo celular. Sua hipermetilação tem associação com maior tamanho do tumor, estádios mais avançados, metástase linfonodal, aumento do risco de recorrência e pior prognóstico (ISHIDA et al., 2005; SAILASREE et al., 2008; SU et al., 2010). Como este tipo de alteração epigenética é também observada em lesões displásicas orais, é possível que seja frequente nas primeiras etapas da carcinogênese e relacionada ao consumo de tabaco e álcool. Tecidos normais de fumantes sem câncer costumam apresentar metilação nesse gene (VON ZEIDLER et al., 2004). Pacientes que possuem lesões pré-malignas portadoras de metilação neste promotor têm risco maior de evolução para câncer oral (CAO et al, 2009). O silenciamento via metilação desse gene tem sido considerado um fator prognóstico útil.

A proteína E-caderina, produto do gene *CDH1*, participa da adesão celular e há estudos relacionando sua ausência/carência com invasão tumoral, metástase e prognóstico desfavorável (CHANG et al., 2002; KUDO et al., 2004). Um estudo com câncer primário oral mostrou que de 18 amostras que não expressavam o *CDH1*, 17 apresentavam hipermetilação (NAKAYAMA et al., 2001). Entretanto, para cavidade oral o índice de hipermetilação pode variar de 0 - 85% (HA; CALIFANO, 2006). Além disso, há estudos que não constataram diferença significativa entre células do CEO e aquelas de tecido saudável (KORDI-TAMANDANI et al., 2010; SHAW et al., 2006). Desse modo, a variabilidade dos perfis de metilação do *CDH1* indica que este gene não seria um bom biomarcador para o câncer oral.

Tabela 3: Perfil de metilação e função de genes relacionados ao CEO. % (n/N) = Frequência de metilação em porcentagem (número de amostras metiladas / total de amostras estudadas). TN (tecido normal), TAT (tecido adjacente ao tumor) e CEO.

Gene	Função	% (n/N)		
		TN	TAT	CEO
<i>APC</i>	Via de sinalização <i>Wnt</i>		6 (3/47)	13 (6/47)
<i>CDH1</i> / <i>E-caderina</i>	Adesão celular		13 (6/47)	42 (20/47)
<i>CDKN2A</i>	Regulação do ciclo celular	0 (0/20)	50 (30/60)	67 (40/60)
<i>CHFR</i>	Regulação do ciclo celular	0 (0/18)	8 (1/13)	46 (6/13)
<i>DCC</i>	Co-ativador transcricional	0 (0/30)	10 (5/48)	59 (54/92)
<i>EDNRB</i>	Atividade do receptor de endotelina	0 (0/30)	10 (5/48)	73 (67/92)
<i>EPCAM</i>	Adesão celular			51% (37/72)
<i>GSTP1</i>	Atividade da glutathione transferase	0 (0/20)	0 (0/60)	0 (0/60)
<i>RASSF1</i>	Progressão do ciclo celular		13 (6/47)	38 (18/47)
<i>TP53</i>	Regulação do ciclo celular			4 (2/48)

Fonte: Adaptado de Gasche e Goel (2012).

Abreviações: *APC* (adenomatous polyposis coli), *CDH1* (cadherin 1), *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase 2A), *CHFR* (checkpoint with forkhead and ring finger domains), *DAPK* (death associated protein kinase), *DCC* (DCC netrin 1 receptor), *EDNRB* (endothelin receptor type B), *EPCAM* (epithelial cell adhesion molecule), *GSTP1* (glutathione S-transferase Pi 1), *MGMT* (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase), *RASSF1A* (Ras association domain family member 1) e *TP53* (tumor protein p53). *Wnt* (wingless-type).

2.5 Estrutura e Função dos Genes *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3*

2.5.1 O GENE *CD44*

O gene *CD44* (*cluster of differentiation 44*) está localizado no locus cromossômico 11p13 e possui tamanho aproximado de 60 kb. Seus 20 exons são divididos em dois grupos e alguns deles possuem expressão variável devido à *splicing* alternativo. Um conjunto de exons, referido como *standard*, é preservado em todos os transcritos e isoladamente origina o RNAm da isoforma mais abundante da proteína, conhecida como *Cd44s* (“s” de *standard*). Já outros, chamados *variant*, são facultativamente adicionados à sequência de *Cd44s* e levam à produção de variantes proteicas, genericamente denominadas por *Cd44v*. As isoformas também podem se diferenciar por resultado de modificações pós-traducionais, como a glicosilação. Detalhamentos são apresentados na Figura 6.

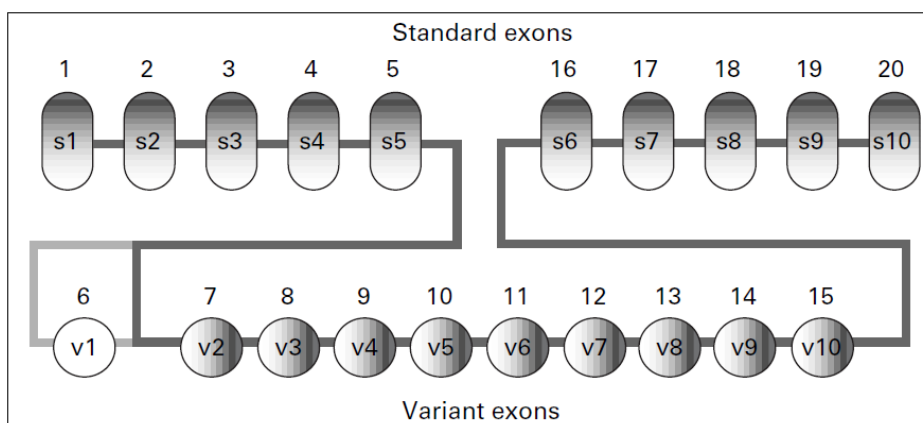


Figura 6: Esquema estrutural do gene *CD44*. *Standard* exons (s1 - s10) estão presentes em todos os transcritos e sozinhos codificam a isoforma proteica mais comum, *Cd44s*. Combinações dos *variant* exons (v1 – v10), geradas por *splicing* alternativo, codificam outras variantes da proteína, denominadas *Cd44v*. Em humanos, o exon 6 (v1) contém um códon de parada e não é normalmente incluso no transcrito.

Fonte: Goodison, Urquidi e Tarin (1999).

Sua ilha CpG possui em torno de 168 pb, estendendo-se de – 98 pb a + 70 pb, conforme mostrado na Figura 7. Neste domínio encontram-se o sítio de início da transcrição e o primeiro exon. Sendo assim, a expressão pode ser sensivelmente afetada por eventos de metilação aberrante.

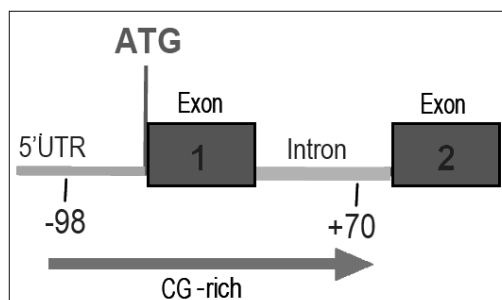


Figura 7: Localização da ilha CpG do gene *CD44*. Indicada pela longa seta na horizontal, entre -98 e +70, em seu interior situam-se o sítio de início da transcrição (ATG) e o primeiro exon. Desse modo, a hipermetilação pode levar a inativação transcricional deste gene.

Fonte: Adaptado de D'Anello et al. (2010).

As proteínas *Cd44* são glicoproteínas transmembrana que atuam na adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular. São as principais receptoras do hialuronato (ácido hialurônico), além de interagirem com colágeno dos tipos I e IV, fibronectina e laminina. Podem ser influentes na migração celular, progressão tumoral e metástase. Outras funções abrangem a degradação do hialuronato, a ativação de linfócitos e linfonodo *homing*, a mielopoiese, a linfopoiese e a angiogênese. (SNEATH e MANGHAM, 1998).

O gene *CD44* é expresso em uma gama de tecidos de origem hematopoiética, endotelial, mesenquimal e epitelial. *Cd44s* pode ser detectada em células hematopoiéticas assim como no sistema nervoso central, nos pulmões, no estômago, no pâncreas, na bexiga e na epiderme. Já as isoformas *Cd44v* têm distribuição mais restrita com padrão de expressão tecido-específico (SNEATH e MANGHAM, 1998).

A cascata metastática, desde o envolvimento linfonodal até comprometimento de órgãos distantes, engloba mudanças na expressão de genes relacionados à adesão e o comprometimento das interações célula – célula e célula – matriz extracelular (KUDO et al. 2004; SNEATH e MANGHAM, 1998). Usando amostras de carcinoma de brônquios metastático, Givchian et al. (1996) observaram redução ou ausência de todas as isoformas de *Cd44*. No caso do neuroblastoma, a inexistência de *Cd44s* é relacionada com baixa sobrevida, sendo portanto um fator de influência no prognóstico (FAVROT et al, 1993).

A exemplo do câncer de próstata, o gene *CD44* tem sido apontado como supressor de metástase. Gao et al. (1997) realizaram a transfecção de *Cd44s* numa linhagem

celular altamente metastática de carcinoma de próstata em camundongos. Neste estudo, a molécula teve ação supressora de metástase, embora a taxa de crescimento e a tumorigenicidade não tenham sido suprimidas. Durante a progressão do tumor, a deficiência de *Cd44s*, tanto a nível de RNAm quanto de proteína, teria correlação com a gradação tumoral, prognóstico ruim e metástase distante (LOU et al, 1999). Para Takarashi et al. (1995), no caso do carcinoma de cólon, a produção de *Cd44s* por células cancerosas reforçaria sua ligação com o hialuronato e seus mecanismos de adesão. A atividade de interação com o hialuronato seria menos proeminente em linhagens celulares com grande potencial metastático em relação àquelas com menor potencialidade.

Estudos sugerem que a baixa transcrição deste gene em células cancerosas teria relação com sua inativação via metilação da região promotora. Lou et al. (1999) e Kito et al. (2001) verificaram índices de hipermetilação de 77,5% e 68%, respectivamente, nos tumores de próstata analisados. Em linhagens de neuroblastoma, Yan et al. (2003) detectaram hipermetilação do promotor e do primeiro exon em basicamente todas as amostras com expressão negativa. Todas aquelas que apresentavam *Cd44* também eram livres de metilação nas mesmas regiões. Segundo Asada et al. (2013), a metilação de *CD44* estaria relacionada com baixa sobrevida em pacientes com o mesmo tipo de câncer.

Tratando-se do epitélio escamoso normal (do qual se origina o carcinoma epidermoide), suas células apresentam níveis elevados tanto de *Cd44s* quanto de *Cd44v* (SNEATH e MANGHAM, 1998). Já no CEO, o trabalho de Hudson, Speight e Watt (1996) indica que células cancerosas apresentam transcrição reduzida de uma ou mais isoformas, sendo esta perda mais comum em tumores pouco diferenciados. Tal como observado para o carcinoma de próstata e para o neuroblastoma, é possível que no CEO a expressão de *CD44* seja comprometida pela hipermetilação, tendo efeito na progressão do tumor, incluindo sua disseminação linfonodal.

2.5.2 O GENE *DAPK*

O gene *DAPK* (*death associated protein kinase*) está situado no cromossomo 9q21.33 e possui 29 exons distribuídos ao longo de sua sequência. Sua ilha CpG abrange os primeiros 525 pb a partir do sítio de início da transcrição, com conteúdo G+C de 64% e 46 dinucleotídeos CG. Seu promotor possui elementos de resposta ao *TGF-β*, assim como sítios ligação para p53 (KATZENELLENBOGEN; BAYLIN; HERMAN, 1999).

A proteína *Dapk* é quinase serina-treonina dependente de cálcio/calmodulina. Também chamada de *Dapk1*, sua família também inclui as enzimas *Dapk2* and *Dapk3*, todas com alto grau de homologia entre seus sítios catalíticos (GOZUACIK; KIMCHI, 2006). Nas proximidades de sua região carboxi-terminal há um domínio de morte homólogo ao de outras proteínas relacionadas às vias de morte celular programada, como o receptor do fator de necrose tumoral (TNF). Localiza-se no citoesqueleto, em associação com filamentos de actina (COHEN; FEINSTEIN; KIMCHI, 1997).

DAPK é fundamental para a indução da morte celular com papel regulatório nas vias do tipo I (apoptótica/dependente de caspase) e tipo II (autofágica/independente de caspase), dependendo do tipo de sinal de morte em questão.

O tipo I (apoptótico) de morte celular inclui a via de sinalização de p53, na ocasião da expressão de oncogenes (como *c-MYC*) ou de danos ao DNA. Esta via requer a participação de p19^{ARF} (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A) cuja função é inibir *Mdm2* (*E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2*) que normalmente promove a degradação de p53. A morte celular apoptótica também pode ocorrer independentemente de p53, com a expressão de *DAPK* sendo induzida por *TGF-β* por intermédio de proteínas *Smad*. Em todos estes casos verifica-se a fragmentação celular e a degradação do DNA (BIALIK; KIMCHI, 2006).

Já no tipo II (autofágico), a atuação de *Dapk* leva à formação de vesículas autofágicas, condensação nuclear sem degradação do DNA, não havendo perda mensurável de potencial de membrana mitocondrial ou liberação de citocromo c. A morte celular independente de caspases pode ser desencadeada por interferon

gama (IFN γ) e conta com a participação da proteína syntaxina e outras relacionadas (BIALIK; KIMCHI, 2006).

Dapk é capaz de fosforilar *MLC* (*myosin light chain*), ativando sua contratilidade, o que favorece a formação de prolongamentos da membrana (*blebs*) e o arredondamento celular, comum aos processos apoptótico e autofágico. A fosforilação de outros substratos do citoesqueleto pode interferir na sinalização das integrinas e afetar a adesão à matriz extracelular. Isso pode desencadear uma via apoptótica dependente de caspase conhecida como *anoikis*. *Dapk* também pode atuar desligando vias de sobrevivência que funcionam em paralelo, como as ativadas por *ERK* (*extracellular signal-regulated kinase*) e *CaMKK* (*CaM-regulated kinase kinase*). Na primeira situação através da retenção citoplasmática de *ERK*, e na segunda por meio de fosforilação direta de *CaMKK* (BIALIK; KIMCHI, 2006).

A Figura 8 integra as informações até aqui apresentadas sobre a ação de *Dapk* em eventos relacionados à morte celular.

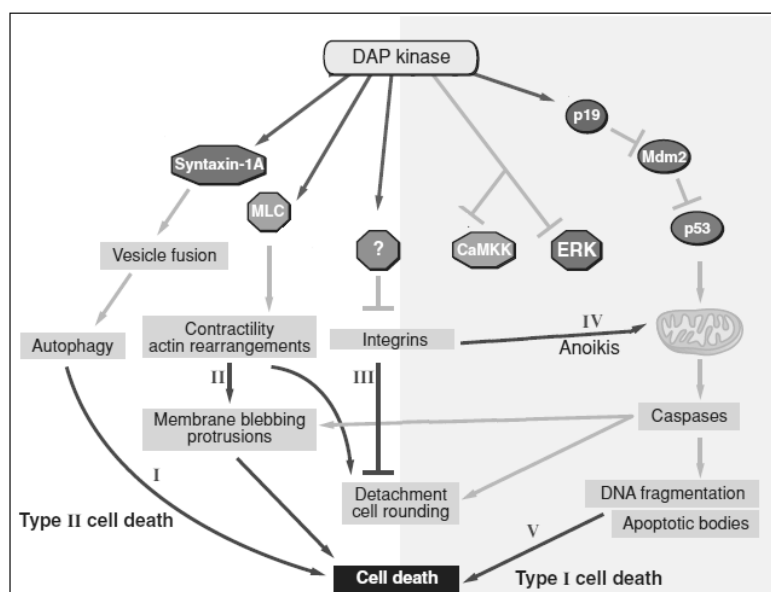


Figura 8: Atuação da proteína *Dapk* na promoção da morte celular. *Dapk* é capaz de induzir tanto a via autofágica (I) quanto a apoptótica (V). Na autofágica, atua fosforilando a syntaxina, relacionada à formação de vesículas autofágicas. Na apoptose, é provável que *Dapk* fosforile p19, levando-o a inibir *Mdm2* que costuma promover a degradação de p53. Essa via também é conhecida como dependente de caspases. Outros mecanismos incluem *MLC* (*myosin light chain*) e integrinas. A fosforilação de *MLC* muda sua contratilidade (II) e desencadeia a formação de prolongamentos da membrana (*membrane blebbing* e *protusions*) e o arredondamento celular (*cell rounding*) que acontecem nos processos apoptótico e autofágico. *Dapk* também pode fosforilar outros componentes do citoesqueleto, afetando a funcionalidade das integrinas e a adesão à matriz extracelular (*detachment*) (III). Esse último fator é capaz de induzir um mecanismo de morte chamado de *anoikis* (IV). Ademais, *Dapk* é capaz de inibir vias de sobrevivência, como aquelas ativadas por *ERK* e *CaMKK*. Fonte: Adaptado de Bialik e Kimchi (2006).

Acredita-se que este gene tenha ação supressora tumoral. A ausência de expressão reduziria a sensibilidade aos sinais de morte celular desencadeados via ativação de oncogenes, mudanças na adesão celular, IFN γ , danos ao DNA, entre outros, conferindo vantagens em diferentes etapas da carcinogênese (BIALIK; KIMCHI, 2004). Nas iniciais, por atenuar os eventos apoptóticos disparados por p53 frente à ativação de oncogenes. Nas mais tardias, por reduzir a sensibilidade das células metastáticas à perda de adesão com a matriz extracelular (RAVEH; KIMCHI, 2001). Uma pesquisa com linhagens celulares de diversos carcinomas demonstrou a supressão de *DAPK* tanto em termos de RNAm quanto da proteína (KISSIL et al., 1997).

A metilação de sua ilha CpG tem destaque como mecanismo de silenciamento, sendo a deleção homozigota e a perda de heterozigosidade eventos menos frequentes (BIALIK; KIMCHI, 2004). A hipermetilação já foi verificada em tumores de linfoma de células B e de tireoide, de carcinoma de pulmão de células não pequenas, de cólon e de mama (RAVEH; KIMCHI, 2001).

Estudos têm obtido sucesso em associar sua hipermetilação com aspectos clinicopatológicos. Em tumores de pituitária foi detectada associação com metástase. Já no carcinoma de pulmão de células não pequenas, a associação foi com tamanho do tumor e acometimento linfonodal. No carcinoma cervical uterino, a hipermetilação foi relacionada com estádios mais avançados da doença (BIALIK; KIMCHI, 2004).

Estudando amostras de CEO, Meneses et al. (2010) constataram deficiência da proteína nos casos pouco diferenciados. Considerando que no estudo de Kissil et al. (1997) a perda da síntese proteica foi concomitante à supressão da expressão em várias linhagens, e que a hipermetilação é importante no silenciamento de *DAPK*, pode-se teorizar que a metilação de ilhas CpG também seja um evento comum no CEO.

2.5.3 O GENE *MGMT*

Com localização cromossômica 10q26, o gene *MGMT* (*O6-methylguanine-DNA-methyltransferase*) é dotado de 5 exons e 4 introns distribuídos ao longo de 300 kb de extensão. O promotor possui 1,2 kb, com sequência desprovida de TATA-box e CAAT-box. Sua ilha CpG estende-se de -552 a +289, possui 97 sítios CpG e abrange tanto o sítio de início da transcrição quanto o primeiro exon, como esquematizado na Figura 9. A estimulação de sua expressão pode ocorrer por ação de glicocorticoides, AMPc, proteína quinase C, danos ao DNA e fatores de transcrição como SP1, AP-1 e AP-2 (NAKAGAWACHI et al., 2003).

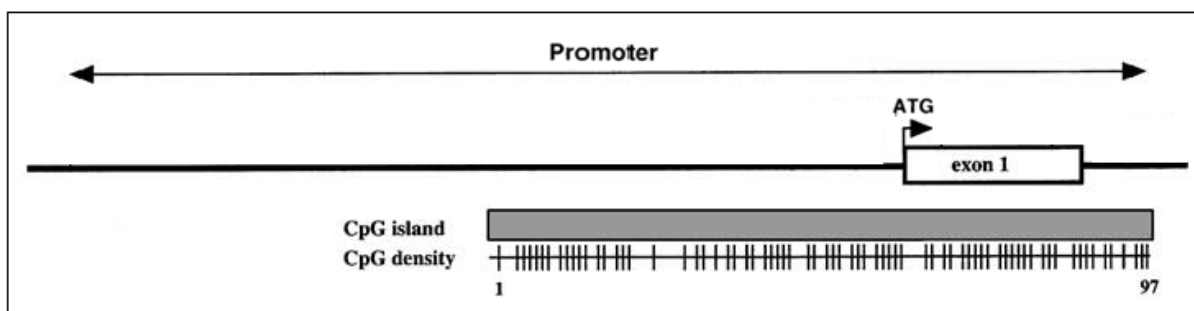


Figura 9: Região promotora e ilha CpG do gene *MGMT*. O promotor, indicado pela longa seta horizontal, possui cerca de 1,2 kb. Sua ilha CpG, representada pela barra cinza, abrange o sítio de início da transcrição (ATG) bem como o primeiro exon. Nela constam 97 sítios CpG, individualmente indicados pelas pequenas linhas verticais (*CpG density*).

Fonte: Adaptado de Nakagawachi et al. (2003).

MGMT codifica uma enzima de reparo do DNA (*Mgmt*) capaz de remover adutos formados pela adição de grupos alquila (como metil) às bases nitrogenadas. Atua especialmente nos casos em que a alquilação ocorre na posição O⁶ de guaninas (O⁶-G), como é o caso de O⁶-metilguanina (O⁶-MG), lesão precursora de mutações. Durante a replicação, O⁶-MG tende a se parear com uma timina e como resultado tem-se uma transição G:C → A:T (JACINTO; ESTELLER, 2007). De maneira menos expressiva, outros tipos de adutos são reparados, como no caso de O⁴-metiltimina (O⁴-MT) (JACINTO; ESTELLER, 2007).

O mecanismo de ação de *Mgmt* consiste em transferir o aduto da guanina para um resíduo de cisteína em seu sítio ativo. Feito isso, a enzima é degradada via ubiquitinação, não sendo reaproveitada provavelmente pelo custo energético da reação reversa (JACINTO; ESTELLER, 2007).

Vários compostos químicos podem atuar como agentes alquilantes, ou seja, como doadores de grupos alquila. Dentre eles pode-se citar as N-nitrosaminas específicas do tabaco como NNK, NNN e DMN, todas carcinógenas e presentes da fumaça de cigarro (CHRISTMANN; KAINA, 2012). Pode-se afirmar que resistência celular aos danos ocasionados por agentes alquilantes varia de acordo com a quantidade de enzimas atuantes, a taxa de síntese *de novo* de *Mgmt* e a taxa de duplicação do DNA (JACINTO; ESTELLER, 2007).

Não raramente a quantidade de *Mgmt* é menor em células cancerosas em relação a suas correspondentes normais. A perda de expressão de *MGMT* observada em tecidos tumorais pode ser resultado de deleção, mutação ou rearranjo. Entretanto, um dos mecanismos mais comuns é a hipermetilação de sua ilha CpG já observada em diversos tipos de câncer como glioma, linfoma, melanoma, de cólon, de esôfago, de estômago e de células não pequenas de pulmão (ESTELLER; HERMAN, 2004).

Seu silenciamento epigenético expõe DNA nuclear ao efeito mutagênico dos adutos, tendo em vista que as conversões G:C → A:T podem afetar genes influentes no processo carcinogênico, como oncogene *K-RAS* e o supressor tumoral *TP53*. Associações entre hipermetilação e mutações em *K-RAS* já foram reportadas para os cânceres de cólon, de estômago e de vesícula biliar. No caso do *TP53*, esse mesmo tipo de relação foi constatada em tumores de pulmão, de cabeça e pescoço, da região colorretal e de fígado (JACINTO; ESTELLER, 2007).

Rodríguez et al. (2007) detectaram deficiência de *Mgmt* em amostras de leucoplasia e de CEO, ao passo que as células de mucosa oral saudável apresentaram quantidades elevadas da enzima. Entre os pacientes com CEO, houve associação entre a perda da proteína e o consumo de tabaco. O estudo de Sawhney et al. (2007) analisando os mesmos tipos de amostras na Índia, obteve resultados semelhantes quanto à detecção da proteína. No grupo amostral com CEO foram encontradas associações com estádios avançados da doença, envolvimento linfonodal e o consumo de *smokeless tobacco*. Em vista do valor informativo das análises proteicas, o perfil de metilação do gene *MGMT* é candidato promissor à função de biomarcador em tumores CEO.

2.5.4 O GENE *RUNX3*

O *RUNX3* (*human runt-related transcription factor 3*) pertence a uma família de genes também inclui *RUNX1* e *RUNX2*. Todos possuem uma região altamente conservada chamada de “domínio *runt*” (BANGSOW et al., 2001). Localiza-se no cromossomo 1p36.1, possui 6 exons e tamanho aproximado de 67 kb, sendo que 35 kb referentes ao primeiro intron. Apresenta duas regiões promotoras (promotor 1 e promotor 2) além de duas ilhas CpG altamente conservadas. Uma situa-se na proximidade do exon 2 e a outra no começo do exon 6 (BANGSOW et al., 2001). Algumas dessas informações são ilustradas na Figura 10.

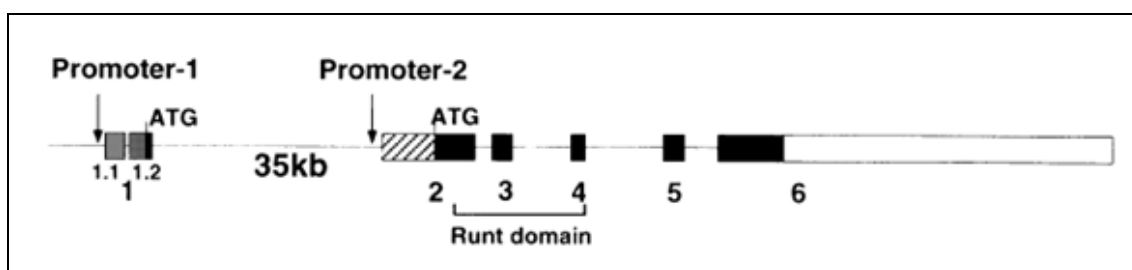


Figura 10: Organização do gene *RUNX3*. Possui 2 regiões promotoras (promoter-1 e promoter-2) e 6 exons (retângulos pretos) dentro de uma sequência de cerca de 67 kb. Retângulos cinza e hachurado indicam regiões 5'-UTR. Ilhas CpG situam-se nas proximidades dos exons 2 e 6. *Runt domain* equivale ao domínio conservado que caracteriza os genes *RUNX*.

Fonte: Bangsow et al. (2001).

Ambas as regiões promotoras não possuem sequências *TATA box* corretamente espaçadas. O promotor 1 apresenta uma região *CAAT box* a 80 pb acima (*upstream*) de seu sítio de início da transcrição. Já o promotor 2, além de apresentar um *CAAT box* invertido a -80 pb, situa-se dentro de uma grande ilha CpG (4,2 kb) que se estende de - 2400 pb a + 1800 pb, com conteúdo GC de 64%, mostrada na Figura 11 (BANGSOW et al, 2001). Uma vez que o sítio de início da transcrição (*TSS – transcription start site*) se localiza no interior dessa ilha, eventos de metilação podem ser cruciais em seu silenciamento (HOMMA et al., 2006).

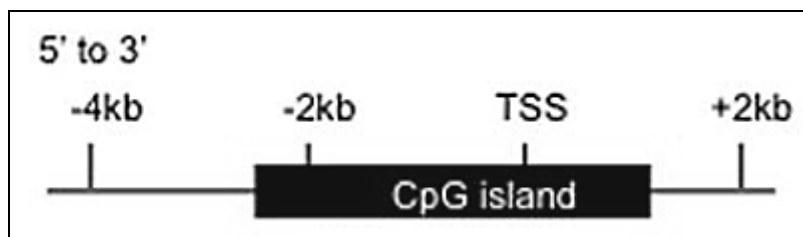


Figura 11: Localização da principal ilha CpG do gene *RUNX3*. Sua extensão abrange o promotor 1 e o sítio de início da transcrição (TSS – *transcription start site*). Desse modo, eventos de metilação poderiam ocasionar a perda de expressão deste gene.

Fonte: Homma et al. (2006).

RUNX3 codifica um fator de transcrição ($_{FT}Runx3$) capaz de se ligar ao DNA por sua união com cofatores conhecidos como *CBF β /PEBP2 β* (*core-binding factor-beta subunit/polyomavirus enhancer-binding protein 2 beta subunit*). A porção *CBF β /PEBP2 β* não se liga ao DNA mas atribui ao complexo alta estabilidade e afinidade ao material genético. Já a porção $_{FT}Runx3$ exerce a função reguladora ao se ligar a promotores/*enhancers* dos genes-alvo relacionados ao destino celular (proliferação, diferenciação ou apoptose), desregulados no contexto neoplásico (SUBRAMANIAM et al., 2009).

A expressão reduzida do *RUNX3* tem sido observada em diversos tipos de câncer, dentre eles o gástrico, o colorretal, o de próstata, o pulmonar, o pancreático, o de ducto biliar, o de bexiga, o hepatocelular e o neuroblastoma. Nestes casos, o gene em estudo tem sido reportado como um supressor de tumor (BAE; CHOI, 2004).

Estudos com camundongos sugerem que essa sua função está relacionada a via de sinalização do *TGF- β* (*transforming growth factor- β*) capaz de induzir a apoptose e interromper a proliferação (BAE e CHOI, 2004; LI et al., 2002). No núcleo, $_{FT}Runx3$ interage com o complexo de proteínas transdutoras de sinal *Smad* (*Smad2-Smad3* e *Smad4*) e com p300, um cofator transcricional. Todos funcionam sinergicamente afetando a função de genes-alvo e são fundamentais na resposta antineoplásica desencadeada pelo *TGF- β* (BAE; CHOI, 2004).

A ação antiproliferativa do *TGF- β* consiste na interrupção de etapas intermediárias e tardias da fase G1 do ciclo celular (SHERR, 1996), através da estimulação de inibidores de *CDKs* (*CKIs*), como p21^{Cip} (ALEXANDROW; MOSES, 1995). Há indícios de que o *RUNX3* poderia aumentar a expressão do gene p21 em resposta

ao *TGF- β* (CHI et al., 2005). Quanto a apoptose induzida por *TGF- β* , há evidências de que o *RUNX3* atue estimulando a transcrição do gene pró-apoptótico *BIM* (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) (YAMAMURA et al., 2006). Existem indícios de que *RUNX3* regule negativamente a angiogênese. A interrupção de sua expressão se correlaciona com o aumento da transcrição do *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*) e angiogênese tumoral (PENG et al., 2006). Os aspectos apresentados até aqui para a ação supressora tumoral do gene *RUNX3* encontram-se sumarizadas na Figura 12.

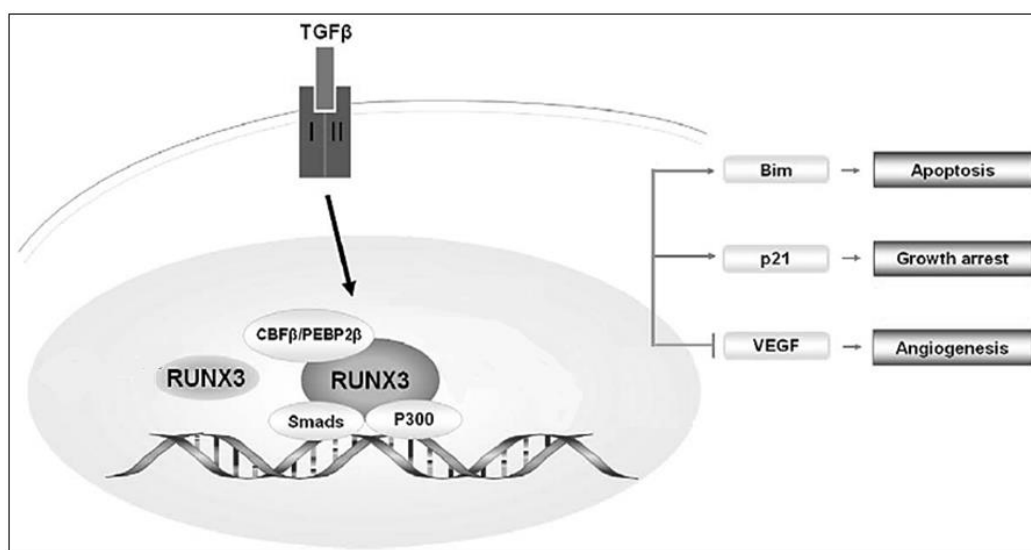


Figura 12: Ação supressora tumoral do gene *RUNX3* por meio da via de sinalização do *TGFβ*. O fator de transcrição codificado por *RUNX3* ($_{FT}Runx3$) atua em conjunto com *Smads* and *p300* na ativação de genes-alvo. O $_{FT}Runx3$ regula positivamente a expressão de *BIM* e *p21* e negativamente a do *VEGF*, tendo assim impacto nas vias de apoptose, ciclo celular e angiogênese. O *CBFβ/PEBP2β* é um cofator que confere alta afinidade ao DNA e estabilidade ao $_{FT}Runx3$.

Fonte: Adaptado de Subramaniam et al. (2009).

Na maioria dos cânceres humanos onde o *RUNX3* tem baixa expressão, eventos como a hipermetilação, a deleção hemizigota e a retenção citoplasmática da proteína (*protein mislocalization*) são responsáveis por comprometer sua atuação supressora (SUBRAMANIAM et al., 2009). A hipermetilação tem destaque como mecanismo de silenciamento em diversos tecidos cancerosos e linhagens celulares, como os de câncer gástrico (HOMMA et al., 2006), de câncer esofágico (LONG et al., 2007), de câncer de pulmão (YANAGAWA et al., 2007), de câncer de mama (JIANG et al., 2008), de câncer pancreático (NOMOTO et al., 2008), de câncer de bexiga (WOLFF et al., 2008) entre outros.

Quanto a tumores CEO, Gao et al. (2009) verificaram níveis baixos ou indetectáveis de $_{FT}Runx3$ em tumores, sendo a hipermetilação um dos mecanismos responsáveis por sua baixa transcrição. No estudo de Tanji et al. (2007), a produção da proteína foi inversamente correlacionada com a proliferação celular e a taxa de sobrevida foi significativamente menor em pacientes com baixa expressão. Estes mesmos autores defendem a presença de $_{FT}Runx3$ como biomarcador, tendo implicação na progressão e no prognóstico deste carcinoma.

A carência da proteína em células cancerosas e sua relação o desenvolvimento do tumor são indicativos que a hipermetilação de *RUNX3* também é candidata a biomarcador também no carcinoma epidermoide oral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a ocorrência de hipermetilação nos genes *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3* e sua potencialidade como biomarcador no câncer oral.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o perfil de metilação da região promotora dos genes *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3* em células tumorais;
- Verificar a existência de associação entre os padrões de metilação e características tumorais como sítio anatômico, estadiamento, tamanho e envolvimento linfonodal;
- Averiguar a existência de associação entre os perfis de metilação e o tabagismo;
- Conferir a existência de associação entre o padrões de metilação e o etilismo.
- Investigar a possível associação entre os perfis de metilação e o consumo simultâneo de tabaco e álcool.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Todos os voluntários foram oriundos do serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (AFECC), localizado no município de Vitória-ES.

4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos indivíduos com diagnóstico conclusivo de carcinoma epidermoide oral (cavidade oral e orofaringe) que não haviam iniciado qualquer terapia antineoplásica. Em todos os casos o tratamento teve como modalidade inicial a ressecção cirúrgica.

4.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram dispensados do estudo pacientes que apresentavam carcinoma epidermoide recidivante, ou que já tinham sido submetidos, em algum momento da evolução da doença, a outras modalidades de terapia antineoplásica, bem como indivíduos que apresentavam condições sistêmicas debilitantes que limitassem sua participação no estudo.

4.1.3 QUESTÕES ÉTICAS

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde (Processo número 318/2011) (ANEXO). Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido durante o atendimento inicial, todos os participantes foram submetidos à entrevista para registro de idade, gênero e histórico do consumo de álcool e o uso do tabaco.

4.2 Amostras Tumorais

Foram selecionados 85 casos de carcinoma epidermoide, sendo 64 amostras de cavidade oral e 21 de orofaringe, coletadas entre os anos de 2012 e 2013. Fragmentos de tumores primários, obtidos durante a ressecção cirúrgica, foram armazenados em *RNAlater RNA Stabilization Reagent* (Ambion – Qiagen, Texas, EUA) e estocados a -80°C até a etapa de extração do DNA. Os dados clínicos foram extraídos dos prontuários dos pacientes e de laudos anátomo-patológicos do tumor.

4.3 Extração do DNA Tumoral

O método de extração de DNA foi adaptado do protocolo fenol clorofórmio de Goelz et al. (1985), com etapas de degradação mecânica e enzimática dos tecidos. Inicialmente foi seccionado um fragmento do tumor contendo de 5 à 20 mg. Cada amostra foi macerada com auxílio de um bisturi e inserida em um microtubo de 1,5 mL contendo 360µL de solução de TE9 (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 9). Foram adicionados 90 µL de proteinase K – SDS (500 µg/mL de proteinase K em 10% de SDS) e os tubos foram colocados no vórtex por 2 min. Feito isto, as amostras foram alocadas em banho-maria a 60°C por 24 – 48 h. Após a incubação, foram acrescentados 450 µL de fenol-clorofórmio em pH 9 (PC9) e o conteúdo foi homogeneizado por 1 min, seguindo-se uma centrifugação de 15.996 x g por 2 min. O sobrenadante aquoso foi transferido para um novo tubo, realizando-se uma nova

etapa de adição de PC9 e centrifugação, assim como na etapa anterior. A um volume prévio de 400 μ L (atingido em alguns casos pelo acréscimo de uma quantidade complementar de TE9), foram incluídos 100 μ L de acetato de amônio 10M. Em seguida o DNA foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado e o conteúdo foi exposto ao vórtex por 30 s. Após uma centrifugação de 15 min a 15.996 x g, o líquido foi descartado com posterior lavagem do material restante com 1 mL de álcool 70%, invertendo-se o tudo 2 vezes. Nova centrifugação de 5 min a 15.996 x g foi sucedida por novo descarte do líquido. Cada tubo foi invertido e deixado em repouso por 10 - 15 min para secagem sobre papel toalha. Em seguida, o DNA foi ressuscitado com 50 μ L -100 μ L de *Low Tris-EDTA* (LoTE) e finalmente colocado em banho-maria a 37°C por 15-20 min. Todas as amostras foram então armazenadas em geladeira a 4°C ou em freezer -20°C.

4.4 Quantificação do DNA

A concentração das amostras de DNA em nanogramas por microlitro (ng/ μ L) foi determinada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, Delaware, EUA).

4.5 Modificação do DNA por Bissulfito de Sódio

Utilizando o kit *methylSEQR™ Bisulfite Conversion* (Applied Biosystems, California, EUA), 300 ng de DNA de cada amostra foram submetidos à conversão por bissulfito. O protocolo do fabricante também contemplou a purificação das amostras modificadas.

O tratamento com bissulfito tem a finalidade de converter citosinas (C) não metiladas em uracilas (U) por meio de uma reações de sulfonação e desaminação, como ilustra a Figura 13. Já as citosinas metiladas (C^m) são conservadas, ou seja, permanecem inalteradas (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006). Isso permite a distinção entre sequências metiladas e não-metiladas, fator importante tendo em vista que as

enzimas DNA polimerases não são capazes de distinguir C e C^m durante a amplificação (GALRÃO, 2011).

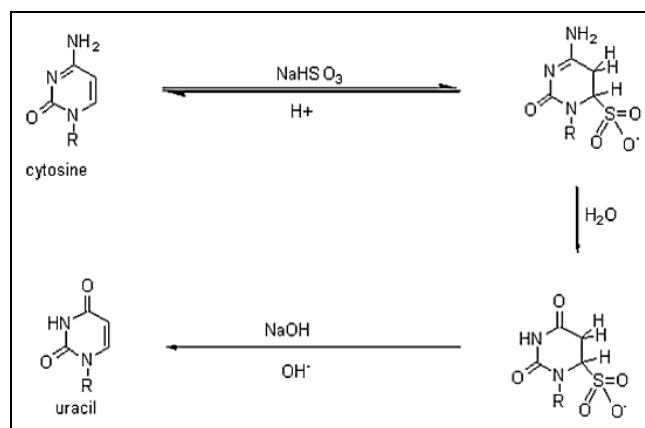


Figura 13: Etapas de conversão de uma base citosina não metilada em uracila na presença de bissulfito de sódio (NaHSO₃).
Fonte: Applied Biosystems (2006).

4.6 MS-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase específica para Metilação

A técnica de reação em cadeia da polimerase específica para metilação (*MS-PCR*, do inglês *methylation-specific polymerase chain reaction*), descrita por Herman et al. (1996), foi utilizada para a amplificação do genes em estudo a partir do DNA tratado com bissulfito. Neste caso, a presença ou ausência dos alelos metilados foi avaliada qualitativamente. Foram utilizados dois pares distintos de *primers*: o *unmet* (U) e o *met* (M), ambos com sequência previamente descrita. O par *unmet* foi destinado às sequências não metiladas, ricas em uracilas. Já o *met* teve como alvo as metiladas cujas citosinas permaneceram inalteradas. As sequências dos *primers* e condições relacionadas à *MS-PCR* são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Sequência dos primers, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos na *MS-PCR*.

Gene	Sequência 5'- 3'	T. A	Tamanho do fragmento
CD44 (D'Anello et al., 2010)			
<i>Unmet</i>	F: GTT TGG TTT GTT ATT TTT GTT TT R: AAT CAA TCT ACA CCA AAC TCA AC	56°C	170 pb
<i>Met</i>	F: CGG TTC GTT ATT TTC GTT TC R: AAT CGA TCT ACG CCA AAC TC	58°C	168 pb
DAPK (Katzenellenbogen et al., 1999)			
<i>Unmet</i>	F: GGA GGA TAG TTG GAT TGA GTT AAT GTT R: CAA ATC CCT CCC AAA CAC CAA	60°C	106 pb
<i>Met</i>	F: GGA TAG TCG GAT GGA GTT AAC GTC R: CCC TCC CAA ACG CCG A		98 pb
MGMT (Esteller et al., 1999)			
<i>Unmet</i>	F: TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT R: AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A	55°C	93 pb
<i>Met</i>	F: TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC R: GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G		81 pb
RUNX3 (Kim et al., 2004)			
<i>Unmet</i>	F: AAG TGG GAA AGT AGA AGT GGT G R: CCA AAC AAA CTA CAA ACA ACC A	62°C	125 pb
<i>Met</i>	F: TAT TCG TTA GGG TTC GTT CGT R: AAA CAA CCA CGA AAA ACG AC	61°C	119 pb

Abreviações: T.A (temperatura de anelamento); pb (pares de base); F (*forward primer*); R (*reverse primer*).

Cada reação de *MS-PCR* continha os seguintes reagentes (fornecidos por Invitrogen - Life Technologies, California, EUA): 2 µL de DNA modificado, 1,5 µL de solução tampão de reação 10X, 0,45 µL de MgCl₂ 1,5 mM, 0,3 µL de dNTPs 10mM, 0,4 µL de cada *primer* 10 nmoles, 0,09 µL de *Platinum Taq DNA Polymerase* e água ultrapura para atingir o volume final de 15 µL. O mix U (*unmet*) e o mix M (*met*) foram preparados separadamente. Os fragmentos foram amplificados em um termociclador Veriti (Applied Biosystems - Life Technologies, Califórnia, EUA) sob as seguintes condições: 95°C por 2 min; 35-38 ciclos de 95°C/T.A°C/72°C (30 seg em cada temperatura) e extensão final de 10 min a 72°C.

Como referência de sequência metilada, foi utilizado o DNA de linfócito normal metilado *in vitro* pela enzima CpG *Methyltransferase* (M. SssI) (Thermo Scientific, Delaware, EUA) utilizada segundo protocolo do fabricante. Apenas para o gene *RUNX3* foi adotada a linhagem celular 5,637 derivada de carcinoma urotelial (CORDEIRO-SILVA et al., 2011). Essas amostras funcionaram como controle positivo para *primers* M e como negativo para *primers* U. Como referência de sequência não-metilada foi escolhido o DNA de linfócitos normais que serviu como controle positivo para *primers* U, não havendo amplificação por *primers* M. Ambos os controles foram modificados por bissulfito. Todas as sequências foram também testadas com DNA não modificado por bissulfito de sódio. Além desses, o controle branco (sem DNA) utilizando água ultrapura também foi incluído em cada amplificação.

4.7 Eletroforese

Os produtos obtidos por *MS-PCR* foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poli(acrilamida) 7%. A solução para o gel continha os seguintes componentes: 8,75 mL de acrilamida 40% (38 g acrilamida e 2 g bis-acrilamida para volume final de 100 mL), 5 mL de Tris-Borato-EDTA (TBE) 10X (108g tris; 55g ácido bórico e 16,6 EDTA para solução de 1 L) e água destilada para volume final de 50 mL. A polimerização foi obtida pela adição sequencial de 350 µL de persulfato de amônio (APS) 10% (0,1g persulfato de amônio para 1 mL de água destilada) e 35 µL de TEMED (tetrametiletenodiamina). As condições da corrida eletroforética foram 220 volts, 302 miliamperes, 100 watts por 1 h. Posteriormente, o gel foi submetido à coloração da seguinte maneira: imersão em solução fixadora (100 mL etanol absoluto e 5 mL de ácido acético glacial para volume final de 1 L) por 6 min; imersão em nitrato de prata 0,1% (0,45g nitrato de prata e água destilada para solução de 450 mL) por 10 min; lavagem em água destilada e submersão em solução reveladora (15g de NaOH e 2,7 mL de formaldeído 37% para volume final de 1L) até a nítida coloração. A Figura 14 é representativa desta etapa das análises.

4.8 Registro, Organização e Análise Estatística dos Resultados

Feita a coloração, a digitalização dos géis foi realizada utilizando um transluminador para gel de eletroforese e uma câmera fotográfica Gel Cam EPH-13 Polaroid (Polaroid Corporation, Minnesota, EUA). A análise estatística da associação entre variáveis foi feita utilizando o teste exato de Fischer por meio do software *R statistical environment* (R CORE TEAM, 2014). Foram consideradas significantes aquelas associações cujo valor de $p < 0,05$.

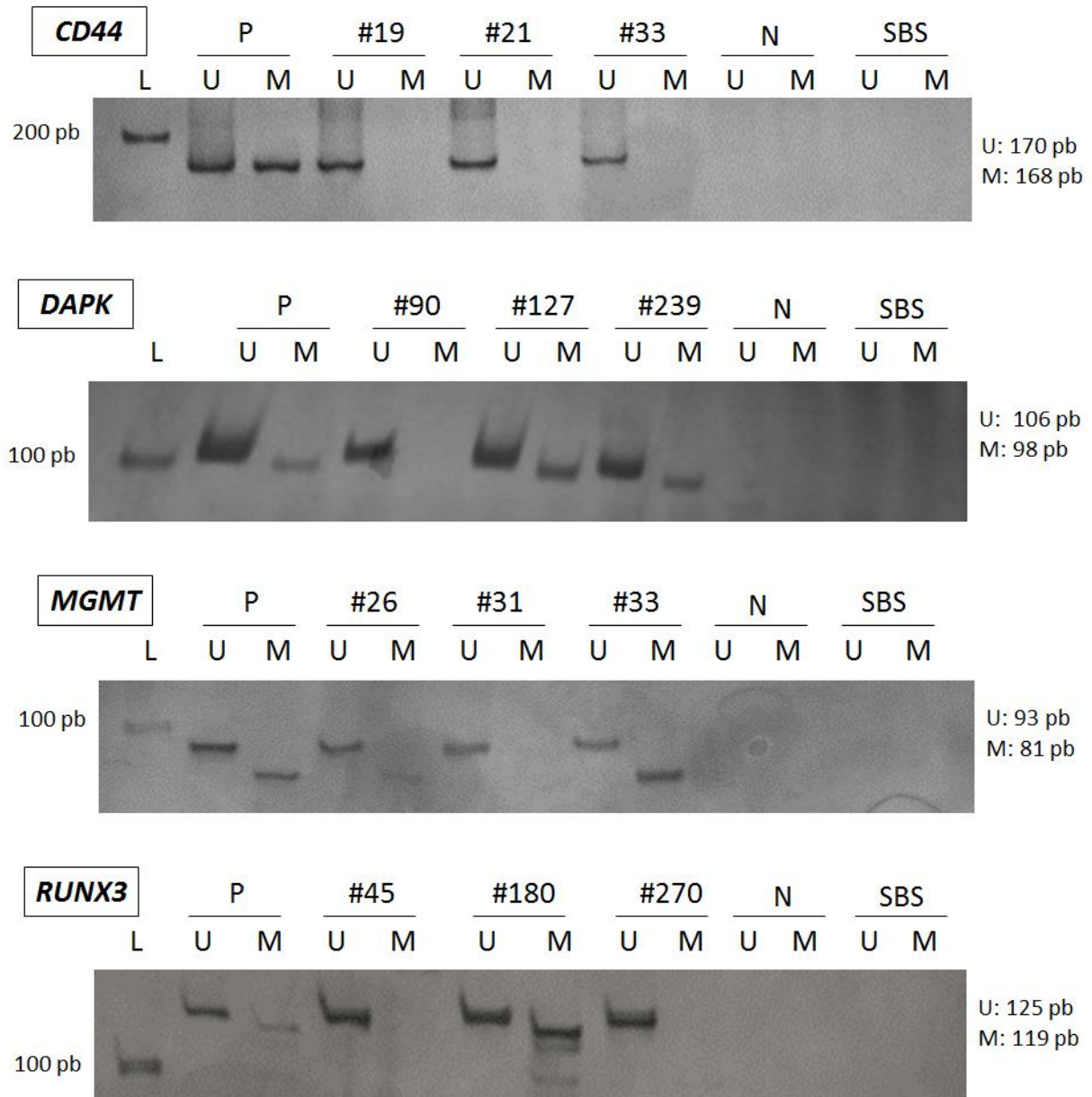


Figura 14: Géis representativos da eletroforese dos produtos de *MS-PCR* dos genes *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3*. L (ladder); P (controle positivo de amplificação); N (controle negativo de amplificação); SBS (controle com DNA não modificado com bissulfito de sódio); # (amostra CEO); U (*primer unmet*); M (*primer met*). Amostras sem hipermetilação (como *CD44* #21) apresentam banda apenas para o *primer U*. Já nas hipermetiladas (como *MGMT* #33) são detectadas bandas para ambos os *primers*. É comum que haja amplificação do *primer U* mesmo nas amostras hipermetiladas haja vista que os fragmentos de tumores obtidos após a ressecção cirúrgica podem ser heterogêneos quanto ao perfil de metilação ou conter resquícios de tecido adjacente.

5 RESULTADOS

Descrição clinicopatológica das amostras

Conforme detalhado na Tabela 5, dentre os 85 indivíduos avaliados para os genes *CD44*, *DAPK* e *MGMT*, 83,5% eram do sexo masculino. A média de idade girou em torno de 57,5 num intervalo compreendido entre 31 e 84 anos de idade. O percentual de tabagistas foi de 56,5% e o de etilistas 60%. Cerca de 37,6% dos pacientes eram usuários de álcool e tabaco simultaneamente. Aqueles que alegaram não consumir quaisquer dessas substâncias somaram 17,6%. Dos tumores estudados, 75,3% tinham origem na cavidade oral e o restante situava-se na orofaringe. Os estádios mais avançados da doença (III e IV) correspondiam a 69,4% dos pacientes. Lesões com mais de 4 cm e invasivas (T3 e T4) englobaram 56,5% das amostras e a ausência de envolvimento linfonodal (N0) foi observada em 51,7% dos casos. Nenhum dos pacientes apresentava metástase distante.

O conjunto amostral do gene *RUNX3* englobou 66 tumores, com média de idade semelhante a mostrada acima para indivíduos que se encaixavam na faixa etária entre 31 e 79 anos. Houve predomínio do gênero masculino (81,8%) e dos hábitos tabagista (66,7%) e etilista (57,6%). O consumo concomitante de álcool e tabaco foi alegado por 48,5% dos pacientes. Cerca de 19,7% dos entrevistados informaram abster-se de bebida alcoólica e de fumo. A maioria dos tumores pertencia a cavidade oral (74,2%) e correspondia à estádios mais avançados (68,2%). Os casos enquadrados nos parâmetros T3 e T4 somaram 53,0% e casos sem envolvimento linfonodal representaram 56,0% das amostras. Nenhum dos pacientes apresentava metástase distante.

Perfil de metilação dos genes *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3*

As porcentagens de amostras positivas para hipermetilação foram: 0% (0/85) para o gene *CD44*, 41,2% (35/85) para o *DAPK*, 20,5% (17/83) para o *MGMT* e 1,5% (1/66) para o gene *RUNX3*. A hipermetilação em pelo menos um dos genes foi constatada em 51,7% (44/85) dos casos. Tumores simultaneamente positivos para *DAPK* e *MGMT* somaram 10,6% (9/85). Um paciente apresentou hipermetilação para os três genes.

Associação entre características clinicopatológicas e a hipermetilação dos genes *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3*

Os resultados de hipermetilação foram comparados com os seguintes parâmetros clinicopatológicos: idade, gênero, consumo de tabaco e álcool, estágio tumoral, tamanho do tumor, acometimento linfonodal e sítio anatômico. Como mostrado na Tabela 6, foi detectada associação entre a metilação do gene *MGMT* e o sítio anatômico cavidade oral ($p = 0,0234$). A hipermetilação simultânea de *DAPK* e *MGMT* não foi significativamente correlacionada com quaisquer dados demográficos, tumorais ou de consumo de álcool e tabaco (dados não apresentados). Os testes estatísticos feitos separadamente para cavidade oral e orofaringe também não encontraram valores de $p < 0,05$ (dados não apresentados).

Tabela 5: Descrição clinicopatológica do total de amostras avaliadas para cada gene.

Variáveis	Subcategorias	Genes	
		CD44, DAPK e	
		MGMT	RUNX3
Total de amostras		85	66
N (%)			
Gênero	Masculino	71 (83,5)	54 (81,8)
	Feminino	13 (15,3)	11 (16,7)
	Desconhecido	1 (1,2)	1 (1,5)
Idade	< 57,5 anos	44 (51,7)	33 (50,0)
	≥ 57,5 anos	40 (47,1)	32 (48,5)
	Desconhecido	1 (1,2)	1 (1,5)
Sítio anatômico	Cavidade oral	64 (75,3)	49 (74,2)
	Orofaringe	21 (24,7)	17 (25,8)
Tabagismo	Sim	48 (56,5)	44 (66,7)
	Não	34 (40,0)	19 (28,8)
	Desconhecido	3 (3,5)	3 (4,5)
Etilismo	Sim	51 (60,0)	38 (57,6)
	Não	31 (36,5)	25 (37,9)
	Desconhecido	3 (3,5)	3 (4,5)
Tabagismo e Etilismo	Sim	32 (37,6)	32 (48,5)
	Não	50 (58,8)	31 (46,9)
Estádio	Inicial (0, I e II)	26 (30,6)	21 (31,8)
	Avançado (III e IV)	59 (69,4)	45 (68,2)
Tamanho do tumor	Tis	2 (2,3)	2 (3,0)
	T1 e T2	35 (41,2)	29 (44,0)
	T3 e T4	48 (56,5)	35 (53,0)
Acometimento linfonodal	Sim (N1, N2 e N3)	41 (48,3)	29 (44,0)
	Não (N0)	44 (51,7)	37 (56,0)

Tabela 6: Variáveis clinicopatológicas e sua relação com a hipermetilação dos genes *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3*. T (total). +/- (presença/ausência de hipermetilação). N(%) = número absoluto (porcentagem). P<0,05. Valores não significativos foram omitidos.

Variáveis		Perfil de Metilação – N(%)								
		T	DAPK+	DAPK-	T	MGMT+	MGMT-	T	RUNX3+	RUNX3-
Amostras		85	35 (41,2)	50 (58,8)	83	17 (20,5)	66 (79,5)	66	1 (1,5)	65 (98,5)
Gênero	M	71	32 (45,1)	39 (54,9)	69	14 (20,3)	55 (79,7)	54	0	54 (100,0)
	F	13	3 (23,1)	10 (76,9)	13	2 (15,4)	11 (84,6)	11	1 (9,1)	10 (90,9)
p				-			-			-
Idade (anos)	< 57,5	44	19 (43,2)	25 (56,8)	43	9 (20,9)	34 (79,1)	33	0	33 (100,0)
	≥ 57,5	40	16 (40,0)	24 (60,0)	39	7 (17,9)	32 (82,1)	32	1 (3,1)	31 (96,9)
Sítio anatômico	Cavidade oral	64	26 (40,6)	38 (59,4)	63	16 (25,4)	47 (74,6)	49	1 (2,0)	48 (98,0)
	Orofaringe	21	9 (42,8)	12 (57,2)	20	1 (5,0)	19 (95,0)	17	0	17 (100,0)
p				-		0,0234				-
Tabagismo	Sim	48	19 (39,6)	29 (60,4)	47	9 (19,2)	38 (80,8)	44	0	44 (100,0)
	Não	34	15 (44,1)	19 (55,9)	33	6 (18,2)	27 (81,8)	19	1 (5,3)	18 (94,7)
p				-			-			-
Etilismo	Sim	51	23 (45,1)	28 (54,9)	49	11 (22,4)	38 (77,6)	38	0	38 (100,0)
	Não	31	11 (35,5)	20 (64,5)	31	4 (12,9)	27 (87,1)	25	1 (4,0)	24 (96,0)
P				-			-			-
Tabagismo e Etilismo	Sim	32	13 (40,6)	19 (59,4)	31	7 (22,6)	24 (77,4)	32	0	32 (100,0)
	Não	50	21 (42,0)	29 (58,0)	49	8 (16,3)	41 (83,7)	31	1 (3,3)	30 (96,7)
p				-			-			-
Estádio	Inicial	26	11 (42,3)	15 (57,7)	25	7 (28,0)	18 (72,0)	21	1 (4,8)	20 (95,2)
	Avançado	59	24 (40,7)	35 (59,3)	58	10 (17,2)	48 (82,8)	45	0	45 (100,0)
p				-			-			-
Tamanho do tumor	Tis	2	2 (100,0)	0	2	1 (50,0)	1 (50,0)	2	0	2 (100,0)
	T1 e T2	35	16 (45,7)	19 (54,3)	34	8 (23,5)	26 (76,5)	29	1 (3,5)	28 (96,5)
	T3 e T4	48	17 (35,4)	31 (64,6)	47	8 (17,0)	39 (83,0)	35	0	35 (100,0)
p				-			-			-
Acometimen to linfonodal	Sim	41	19 (46,3)	22 (53,7)	40	6 (15,0)	34 (85,0)	29	0	29 (100,0)
	Não	44	16 (36,4)	28 (63,6)	43	11 (25,6)	32 (74,4)	37	1 (2,7)	36 (97,3)
p				-			-			-

6 DISCUSSÃO

A hipermetilação de ilhas CpG de genes relacionados ao câncer tem sido considerada um evento importante na evolução do carcinoma epidermoide oral (CEO). A partir da análise de 85 amostras deste carcinoma, objetivou-se avaliar a existência de hipermetilação nos genes *CD44*, *DAPK*, *MGMT* e *RUNX3*, assim como sua relação com fatores clinicopatológicos. Os índices de hipermetilação observados foram, respectivamente, 0%, 41,2%, 20,5% e 1,5%, englobando 51,7% dos pacientes. Cerca de 10,6% dos tumores foram positivos para *DAPK* e *MGMT* simultaneamente. A análise estatística revelou associação entre a hipermetilação de *MGMT* e o sítio anatômico cavidade oral ($p=0,0234$).

Estudos anteriores investigaram o perfil de metilação do gene *MGMT* em tumores de CEO. Kulkarni e Saranath (2004), utilizando *MS-PCR*, verificaram hipermetilação em 51.7% (31/60) dos tumores e em 26.7% (16/60) das mucosas orais normais dos mesmos pacientes. Não houve resultados positivos entre os 20 raspados bucais de pessoas saudáveis. Viswanathan, Tsuchida e Shanmugam (2003) constataram taxas de 41% (40/99) e de 0% (0/25) nas amostras de tumor e mucosa oral normal coletadas de cada paciente, usando enzimas de restrição sensíveis a sítios CpG metilados. Supic et al. (2009) encontraram 33.8% (23/77) de tumores hipermetilados, por *nested MS-PCR*. Já Wong, Lee e Liu (2011), por meio de *MS-PCR*, observaram índices de 31.3% (20/64) e 25% (16/64) em tumores e células normais de cada paciente. Neste estudo, a hipermetilação foi significativamente maior naqueles tumores com envolvimento linfonodal.

Quanto à hipermetilação de *MGMT* em tumores de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP), analisados pela técnica de *MS-PCR*, Sanchez-Céspedes et al. (2000) e Rosas et al. (2001) verificaram índices de 33% (31/95) e 23% (7/30). Já nos estudos de Koutsimpelas et al. (2012) e Zuo et al. (2004), a ocorrência de hipermetilação - 57% (13/23) e 18,1% (17/94) - teve relação significativa com a baixa produção da proteína.

A taxa de hipermetilação verificada neste estudo (20,5%) se inclui no intervalo de frequências observadas na literatura, de 18,1 – 57%. Esta pesquisa também constatou associação significativa entre a hipermetilação de *MGMT* e o sítio anatômico cavidade oral ($p=0,0234$).

O *MGMT* codifica uma enzima de reparo de adutos de O^6 -metilguanina (O^6 -MG) gerados pela interação do DNA com agentes alquilantes presentes, por exemplo, na fumaça de cigarro (CHRISTMANN; KAINA, 2012). Sua ação protegeria a célula do efeito mutagênico de O^6 -MG, capaz de gerar transições G:C → A:T em genes importantes como *K-RAS* e *TP53* (JACINTO; ESTELLER, 2007). Nestes termos, a hipermetilação de *MGMT* teria consequências favoráveis ao câncer.

Especialmente na cavidade oral, a deficiência no reparo de adutos no DNA associa-se com uma direta exposição a carcinógenos alquilantes, como os derivados da fumaça do cigarro. Esta combinação potencializa o impacto negativo de cada fator isoladamente e pode ser importante na promoção do câncer neste sítio. Em outras regiões anatômicas, como na orofaringe, tal deficiência nos mecanismos de reparo pode ter menor impacto, haja vista o contato menos intenso com as substâncias de risco.

É possível sugerir que tumores da cavidade oral positivos para hipermetilação em *MGMT* sejam mais sensíveis aos efeitos citotóxicos da quimioterapia com agentes alquilantes. Isso porque o silenciamento epigenético de *MGMT* torna as células cancerosas mais suscetíveis aos danos causados, por exemplo, pelo O^6 -cloroetilguanina, aduto formado pela ação do quimioterápico bis-(2-chlorethyl)-nitrosourea (BCNU). Outros alquilantes terapêuticos incluem temozolomida, procarbazina e dacarbazina (GERSON, 2004).

Quanto ao gene *DAPK*, sua hipermetilação foi detectada em 41,2% (35/85) das amostras desta pesquisa. Apesar do índice relevante, nenhuma associação significativa com aspectos clinicopatológicos foi revelada, assim como ocorrido em outros trabalhos com CEO e CECF explorados a seguir.

Li et al. (2013), usando *MS-PCR*, detectaram hipermetilação em 71,69% (38/53) dos tumores, estando associada à baixa expressão de *DAPK*. Kulkarni e Saranath (2004), por *MS-PCR*, analisaram tecido tumoral e mucosa normal adjacente dos

mesmos pacientes, detectando hipermetilação em 68.3% (41/60) e 60% (36/60) das amostras, respectivamente. Supic et al. (2009) observaram 36.4% (25/77) de amostras hipermetiladas usando nested *MS-PCR*. Já entre amostras de CECP também avaliadas por *MS-PCR*, Rosas et al. (2001) verificaram que 33% (10/30) dos tumores estavam hipermetilados para este gene. Hasegawa et al. (2002) encontraram resultados positivos em 23.8% (19/80) dos casos. Quanto a hipermetilação em células de indivíduos saudáveis, estudada por Li et al. (2013) e Kulkarni e Saranath (2004), as taxas foram nulas.

Outras pesquisas foram bem-sucedidas na busca por associações com características tumorais e comportamentais. Wong, Lee e Liu (2011), trabalhando com tumores e mucosa oral normal de pacientes com CEO, observaram índices de hipermetilação equivalentes a 45.3% (29/64) e 40,6% (26/64), respectivamente, por meio de *MS-PCR*. Neste estudo, a taxa de hipermetilação de *DAPK* foi significativamente maior nos 18 casos positivos para envolvimento linfonodal. Com tumores de CECP, Sanchez-Cespedes et al. (2000) utilizando a mesma técnica, encontraram associação entre a hipermetilação de 18% (17/92) das amostras e as características envolvimento linfonodal e estágio avançado da doença. Liu et al. (2012) analisaram casos de CEO e lesões pré-cancerosas (leucoplasias) pela técnica de QMSP (*real-time quantitative methylation-specific PCR*), detectando hipermetilação em 46.9% (15/32) e 19.5% (15/77) das amostras, respectivamente. Entre as leucoplasias, a hipermetilação foi significativamente diferente entre aqueles que fumavam há mais de 20 anos (40%) em relação aos demais (10,7%).

A hipermetilação de *DAPK* se mostra um fenômeno comum nos carcinomas epidermóides que acometem tanto a região oral quanto outros sítios de cabeça e pescoço, ainda que nem sempre associada significativamente a fatores clinicopatológicos. Os estudos de Li et al. (2013) e Kulkarni e Saranath (2004) indicam que a mucosa oral de indivíduos saudáveis apresenta perfil livre de metilação. Sendo assim, essa alteração epigenética parece ser própria de tumores e daquelas células que, embora aparentemente normais, já apresentam aberrações moleculares em virtude da exposição a carcinógenos. Kulkarni e Saranath (2004) e Wong, Lee e Liu (2011) mostram que a mucosa supostamente normal de pacientes pode apresentar taxas de hipermetilação semelhantes à de tumores. Adicionalmente, Liu et al (2012) detectaram essa mesma alteração em lesões pré-

cancerosas/leucoplasias. A hipermetilação de *DAPK* também se mostrou significativamente mais frequente entre os indivíduos que fumavam há mais de 20 anos.

Sabe-se que *DAPK* é fundamental para a ativação de diversos mecanismos de morte celular, dependentes ou não de caspases, sendo a via de sinalização p19^{ARF}/p53 uma das mais clássicas (BIALIK; KIMCHI, 2006). Uma vez que a supressão das vias de morte é uma etapa crítica para o surgimento do tumor, a hipermetilação de *DAPK* pode ser sugestiva de um maior potencial maligno. Em conjunto com outras alterações moleculares, sua detecção em tecido normal adjacente ao tumor, em lesões pré-cancerosas e em margens cirúrgicas pode indicar maior chance de evolução de um carcinoma.

Diferentemente dos resultados obtidos aqui, outros estudos com CEO obtiveram dados significativos para o gene *RUNX3* utilizando *MS-PCR*. Gao et al. (2009) detectaram hipermetilação em 70% (21/30) das amostras, fato que foi associado à baixa expressão deste gene. Entre os tecidos normais, nenhuma amostra foi positiva (0/10). Não houve sucesso na associação com dados clinicopatológicos. Trabalhando com CEO apenas de língua, Supic et al. (2011a) constataram hipermetilação em 25% (19/76) dos tumores. Houve associação com o estágio tumoral e o envolvimento linfonodal. A análise de Cordeiro-Silva et al. (2012), constatou hipermetilação em 17% (8/47) dos tumores. Em outro estudo desse mesmo grupo, não foi constatada hipermetilação em 41 indivíduos saudáveis e em 71 raspados bucais de pacientes (CORDEIRO-SILVA et al., 2011). Ambos os trabalhos não verificaram associações significantes.

O gene *RUNX3* é tradicionalmente apresentado como supressor tumoral. A hipermetilação em células cancerosas comprometeria sua atuação na via de sinalização do *TGF-β*, conhecida por seu efeito inibidor do crescimento e promotor da apoptose. Todavia, nesta pesquisa a hipermetilação foi verificada em apenas 1,5% (1/66) das amostras, o que parece contestar sua importância no desenvolvimento desse carcinoma. Somando-se os dados da literatura, os índices podem variar de 1,5 – 70%. Sendo assim, mesmo representando um mecanismo de silenciamento gênico em células tumorais, a hipermetilação apresenta pouca potencialidade como biomarcador em tumores CEO.

Recentemente, estudos com CECP têm sugerido uma atuação oncogênica de *RUNX3*. Tsunematsu et al. (2009) e Kudo, Tsunematsu e Takata (2011) defendem que na mucosa oral saudável este gene estaria epigeneticamente silenciado, já que sua expressão só seria requerida durante o desenvolvimento embrionário. Durante a carcinogênese, sua ação oncogênica seria desencadeada pela desmetilação de sua ilha CpG, favorecendo o crescimento celular e a inibição da apoptose.

RUNX3 codifica um fator de transcrição que, junto com *Smads*, atua como efetor da via do *TGF-β*. Esta rota de sinalização pode apresentar ação supressora de tumor nas etapas iniciais e promotora de invasão e metástase nos estágios mais tardios (LEBRUN, 2012). Desse modo, é possível que este gene tenha uma dualidade de atuação no desenvolvimento do CEO, o que poderia ajudar no entendimento das aparentes incongruências entre os resultados dessa pesquisa com os da literatura. Vale ressaltar que mesmo nos estudos de Supic et al. (2011a) e Cordeiro-Silva et al. (2012) uma parcela relevante de suas amostras (75% e 83%, respectivamente) não apresentou hipermetilação, o que sugere que *RUNX3* pode estar sendo expresso.

Dentre os trabalhos disponíveis para o gene *CD44*, o de Franzmann et al. (2007) é o que mais se aproxima da abordagem aqui adotada. Este estudo, utilizando *MS-PCR* e amostras de enxagues bucais, verificou hipermetilação em 9 de 11 de pacientes com CECP e em 0 de 10 indivíduos com doença benigna, ambos os grupos com baixos níveis da proteína.

Sabe-se que *CD44* codifica glicoproteínas transmembrana responsáveis por processos de adesão célula - célula e célula - matriz extracelular. Em algumas neoplasias, sua hipermetilação mostrou relação com baixa expressão e a ocorrência de metástase distante (LOU et al., 1999; YAN et al. 2003). Dentre as amostras aqui utilizadas, nenhuma foi positiva para hipermetilação, podendo indicar que as células cancerosas teriam transcrição ativa.

Considerando que este gene é codificador de diversas isoformas proteicas, seria interessante pensar no efeito de sua expressão em termos do perfil de produção de *Cd44s* e *Cd44v*. No estudo de Gao et al. (1997), com uma linhagem de carcinoma de próstata em camundongos, a presença de *Cd44s* é considerada característica anti-metástase. Já no estudo de Günthert et al. (1991), usando linhagens celulares

de adenocarcinoma pancreático de camundongos, a existência de *Cd44v* é vista como um fator promotor de metástase. O modo de atuação deste gene pode depender do tipo celular e das isoformas expressas. No caso do CEO, a ausência de hipermetilação sugere que o gene continua transcricionalmente ativo na transição tecido normal - tecido neoplásico, porém, o padrão de expressão das isoformas pode ter sido alterado no processo.

Em sintonia com os resultados obtidos neste trabalho para CEO, nenhuma hipermetilação foi detectada entre as 21 amostras clínicas de neuroblastoma estudadas por Yan et al. (2003), independentemente da expressão de *CD44*. Incluindo o fato de que neste mesmo estudo a hipermetilação foi observada entre linhagens celulares, é possível propor que a expressão deste gene seja também influenciada por mecanismos independentes de metilação.

7 CONCLUSÕES

As frequências de hipermetilação observadas e as análises estatísticas indicam que, dos genes inicialmente propostos, apenas *DAPK* e *MGMT* apresentam potencialidade como biomarcadores de prognóstico no CEO. Ambos demonstram índices de hipermetilação consideráveis entre células cancerosas e, no caso do *MGMT*, houve sucesso na associação com características tumorais. A ausência de relação significativa com os fatores de risco pode ser fruto de particularidades amostrais.

Considerando que a hipermetilação de genes relacionados ao câncer possui um padrão tumor-específico de ocorrência, é possível que, em associação com outras regiões hipermetiladas, esses genes possam constituir uma assinatura epigenética deste tipo de carcinoma. Essa ferramenta seria útil no gerenciamento clínico da doença, uma vez que sua prospecção poderia revelar o potencial maligno de certas lesões e favorecer o diagnóstico precoce. Sabe-se que, em se tratando de CEO, o prognóstico desfavorável e mortalidade são em grande parte devidos ao diagnóstico tardio.

No caso dos genes *CD44* e *RUNX3*, o perfil de metilação mostra pouca ou nenhuma viabilidade de uso como biomarcador de prognóstico no CEO. A hipermetilação não demonstra ser um mecanismo comum de inativação transcricional neste tipo de tumor. Outras abordagens, como aquelas interessadas em verificar a produção de RNAm, presença e a funcionalidade da proteína, podem ajudar a elucidar o papel desses genes neste carcinoma. Em vista de sua atuação em células normais, é possível que outros de seus aspectos moleculares sejam informativos e úteis como biomarcadores.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIEN, J. et al. Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. **Oral Oncology**, 2013.

ALEXANDROW, M.G.; MOSES, H.L. Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. **Cancer Res**, v.55, p. 1452-1457, 1995.

ALVES, C. C. M. et al. Carcinoma epidermóide de Boca: Relação entre Graduação Histopatológica e Características Clínicas da Neoplasia. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, v.11, n.4, p.485-89, 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2007**. Atlanta: American Cancer Society, 2007. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/caff2007pwse_curedpdf.pdf>. Acesso em: maio 2014.

ANNERTZ, K. et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. **Int J Cancer**, v.101, p. 95-99, 2002.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Applied Biosystems methylSEQR™ Bisulfite Conversion Kit – Protocol**. Foster City, 2006.

ARRESE, L. C.; LAZARUS, C. L. Special Groups: Head and Neck Cancer. **Otolaryngol Clin N Am**, v.46, p. 1123–1136, 2013.

ASADA, K. et al. Stronger prognostic power of the cpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. **Jpn J Clin Oncol.**, v.43, n.6, p. 641–645, 2013.

BAE, S-C.; CHOI, J-K.. Tumor suppressor activity of RUNX3. **Oncogene**, v.23, p. 4336–4340, 2004.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral Cancer: Clinical Features. **Oral Oncology**, v. 46, n.6, p. 414-417, 2010.

BANGSOW, C. et al. The RUNX3 gene - sequence, structure and regulated expression. **Gene**, v. 279, p. 221–232, 2001.

BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. (Eds). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon 2005.

BIALIK, S.; KIMCHI, A. DAP-kinase as a target for drug design in cancer and diseases associated with accelerated cell death. **Seminars in Cancer Biology**, v.14, p. 283–294, 2004.

_____. The Death-Associated Protein Kinases: Structure, Function, and Beyond. **Annu. Rev. Biochem.**, v.75, p.189–210, 2006.

BIRD, A. The essentials of DNA methylation. **Cell**, v.70, p. 5–8, 1992.

BORGES, D. M. L. et al. Mortalidade por câncer de boca e condição sócio-econômica no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, n.2, p. 321-327, 2009.

BOYLE, P.; LEVIN, B. (Ed). **World Cancer Report 2008**. World Health Organization. International agency for research on Cancer. Lyon: WHO Press, 2008. 503p. Disponível em: < <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/index.php>>. Acesso em: maio 2014.

BRENER, S. et al. Carcinoma epidermoidebucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.1, p. 63-69, 2007.

CAO, J. et al. Methylation of p16 CpG island associated with malignant progression of oral epithelial dysplasia: a prospective cohort study. **Clin Cancer Res.**, v.15, n.16, p. 5178–5183, 2009.

CARRARD, V. C. et al. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.54, n.1, p. 49-56, 2008.

CHANG, H. W. et al. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. **Cancer**, v. 94, p. 386–92, 2002.

CHI, X. Z. et al. RUNX3 suppresses gastric epithelial cell growth by inducing p21(WAF1/Cip1) expression in cooperation with transforming growth factor {beta}-activated SMAD. **Mol. Cell. Biol.** v.25, p. 8097–8107, 2005.

CHRISTENSEN, B. C. et al. Aging and Environmental Exposures Alter Tissue-Specific DNA Methylation Dependent upon CpG Island Context. **PLoS Genet**, v.5, n.8, 2009.

CHRISTMANN, M.; KAINA, B. O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): impact on cancer risk in response to tobacco smoke. **Mutation Research**, v.736, p. 64– 74, 2012.

CLARK, S. J.; MELKI, J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? **Oncogene**, v.21, p. 5380–5387, 2002.

COHEN, O.; FEINSTEIN, E.; KIMCHI, A. DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. **EMBO J.**, v.16, n.5, p. 998–1008, 1997.

CORDEIRO-SILVA, M. F. et al. Methylation analysis of cancer-related genes in non-neoplastic cells from patients with oral squamous cell carcinoma. **Mol Biol Rep**, v.38, n.8, p. 5435-5441, 2011.

_____. Promoter hypermethylation in primary squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a study of a Brazilian cohort. **Mol Biol Rep**, v.39, p. 10111–10119, 2012.

D'ANELLO et al. Epigenetic control of the basal-like gene expression profile via Interleukin-6 in breast cancer cells. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 300, 2010.

DAS, P. M.; SINGAL, R. DNA Methylation and Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.22, n.22, p. 4632-4642, 2004.

DENISSENKO, M. F. et al. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. **Science**, v.274, n.5286, p.430–432, 1996.

DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 24, p. 9–17, 2005.

EDEN, A. et al. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. **Science**, v.300, p. 455, 2003.

ESTELLER, M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 629–656, 2005.

ESTELLER, M. et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. **Cancer Research**, v.59, n.4, p. 793-797, 1999.

ESTELLER, M.; HERMAN, J. G. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. **Oncogene**, v. 23, p.1–8, 2004.

FAKHR, M. G. et al. DNA Methylation Pattern as Important Epigenetic Criterion in Cancer. **Genetics Research International**, 2013. 9p.

FALLS, J.G. et al. Genomic imprinting: implications for human disease. **Am. J. Pathol.**, v. 154, p. 635–647, 1999.

FARIA, P. R. et al. Clinical presentation of patients with oral squamous cell carcinoma when first seen by dentists or physicians in a teaching hospital in Brazil. **Clin Oral Investig.**, v.7, n.1, p. 46-51, 2003.

FAVROT, M. et al. CD44—a new prognostic marker for neuroblastoma. **N Engl J Med**, v.329, p.196, 1993

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. **Biochem Biophys Res Commun**, v.111, p.47-54, 1983.

FERLAY J. et al. **GLOBOCAN 2012: Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012**. International Agency for Research on Cancer, Lyon: IARC CancerBase, v.1, n.11, 2013. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr> >. Acesso em: maio 2014.

FERLITO, A. et al. Changing concepts in the surgical management of the cervical node metastasis. **Oral Oncol**, v. 39, p. 429-435, 2003.

FRAGA, M.F. et al. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. **Cancer Res.**, v.64, p. 5527–5534, 2004.

FRANCO, E. L. et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer**, v.43, n.6 , p. 992-1000, 1989.

FRANZMANN, E. J. et al. Soluble CD44 Is a Potential Marker for the Early Detection of Head and Neck Cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v.16, n.7, p. 1348–55, 2007.

GALRÃO, Ana Luiza Resende. **Metilação do gene simportador sódio-iodo (NIS) em tumores de tireoide**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GAO, A. et al. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. **Cancer Res**, v.57, p. 846–849, 1997.

GAO, F. et al. Frequent inactivation of RUNX3 by promoter hypermethylation and protein mislocalization in oral squamous cell carcinomas. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.135, p. 739–747, 2009.

GASCHE, J. A. et al. Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. **Int J Cancer**., v.129, n.5, p. 1053–1063, 2011.

GASCHE, J. A.; GOEL, A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. **Future Oncol.**,v. 8, n.11, p. 1407–1425, 2012.

GENDEN, E.M. et al. Neck disease and distant metastases. **Oral Oncol**, v.39, p. 207-212, 2003.

GERSON, S. L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. **Nature Reviews**, v.4, p. 296-307, 2004.

GERVÁSIO, O. L. A. S. et al. Oral squamous cell carcinoma: A retrospective study of 740 cases in a Brazilian Population. **Braz Dent J**, v.12, n.1, p. 57-61, 2001.

GIGLIOTTI, M. P. et al. Principais mecanismos de atuação do álcool no desenvolvimento do câncer oral. **Odontologia. Clín.-Científ.**, Recife, v.7, n.2, p. 107-112, 2008.

GIVEHCHIAN, M. et al. Expression of CD44 splice variants in normal respiratory epithelium and 11 bronchial carcinomas: no evidence for altered CD44 splicing in metastasis. **Oncogene**, v.12, p1137–1144, 1996.

GOELZ, S.E.; HAMILTON, S. R.; VOGELSTEIN, B. Purifications of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded tissue. **Biochemical and Biophysical Reserch Communications**, v. 130, p. 118-126, 1985.

GOODISON, S.; URQUIDI, V.; TARIN, D. CD44 cell adhesion molecules. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, v.52, p.189–196, 1999.

GOUVEA, S. A. et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos do câncer bucal em um hospital oncológico: predomínio de doença localmente avançada. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, v.39, n.4, p. 261-265, 2010.

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. DAPk Protein Family and Cancer. **Autophagy**, v.2, n.2, p. 74-79, 2006.

GREGER, V. et al. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. **Hum. Genet.**, n.83, p. 155–158, 1989.

GREGORY, P.D.; WAGNER, K.; HORZ, W. Histone acetylation and chromatin remodeling. **Exp. Cell Res**, v. 265, p. 195–202, 2001.

GÜNTHER, U. et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. **Cell**, v.65, p. 13–24, 1991.

HA, P. A.; CALIFANO, J. A. Promoter methylation and inactivation of tumour suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. **Lancet Oncol**, v.7, p. 77–82, 2006.

HARRIS, J. P.; PENN, I. Immunosuppression and the development of malignancies of the upper airway and related structures. **Laryngoscope**, v.91, n.4, p. 520-288, 1981.

HASEGAWA, M. et al. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. **Oncogene**, n.21, p. 4231-4236, 2002.

HERMAN, J.G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 93, p. 9821-9826, 1996.

HEROIU, A. D.; DANCIU, C. E.; POPESCU, C. R. Multiple Cancers of the Head and Neck. **Maedica – a Journal of Clinical Medicine**, v.8, n.1, p. 80-85, 2013.

HIRST, M.; MARRA, M. A. Epigenetics and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 136–146, 2009.

HOMMA, N. et al. Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. *Cancer Sci*, v.97, p. 51–56, 2006.

HOMANN, N. et al. Poor dental status increases acetaldehyde-production from ethanol in saliva: A possible link to increased oral cancer risk in heavy drinkers. **Oral Oncol**, v. 37, p. 153–158, 2001.

HUDSON, D.; SPEIGHT, P.; WATT, F. Altered expression of CD44 isoforms in squamous-cell carcinomas and cell lines derived from them. **Int J Cancer**, v.66, p. 457–63, 1996.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Condutas do INCA: Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.47, n.4, p. 361-376, 2001.

_____. **Falando Sobre Câncer da Boca**. Rio de Janeiro: INCA, 2002. 52 p.

_____. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.

_____. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p.

ISHIDA E. et al. Promotor hypermethylation of p14ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v.41, n.6, p. 614–622, 2005.

JACINTO, F. V.; ESTELLER, M. MGMT hypermethylation: A prognostic foe, a predictive friend. **DNA Repair**, v.6, p. 1155–1160, 2007.

JIANG, Y. et al. Expression of RUNX3 gene, methylation status and clinicopathological significance in breast cancer and breast cancer cell lines. **Pathobiology**, v.75, p.244–251, 2008.

KATZENELLENBOGEN, R.A.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J.G. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. **Blood**, v.93, n.12, p. 4347-4353, 1999.

KIM, T.Y. et al. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. **Lab Invest**, v.84, n.4, p. 479–484, 2004.

KISSIL et al. DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. **Oncogene**, v.15, p. 403-407, 1997.

KITO, H. et al. Hypermethylation of the CD44 Gene is Associated With Progression and Metastasis of Human Prostate Cancer. **The Prostate**, v.49, p. 110-115, 2001.

KORDI-TAMANDANI, D. M. et al. Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer. **Arch Oral Biol.**, v.55, n.10, p. 809–814, 2010.

KORNBERG, R. D.; LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. **Cell**, v.98, p. 285–94, 1999.

KOUTSIMPELAS, D. et al. Promoter methylation of MGMT, MLH1 and RASSF1A tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: Pharmacological genome demethylation reduces proliferation of head and neck squamous carcinoma cells. **Oncology Reports**, n. 27, p. 1135-1141, 2012.

KRISTENSEN, L. S.; NIELSEN, H. M.; HANSEN, L. L. Epigenetics and cancer treatment. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 131–142, 2009.

KUDO Y. et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. **Clin Cancer Res**, v.10, p.5455–5463, 2004.

KUDO, Y.; TSUNEMATSU, T.; TAKATA, T. Oncogenic Role of RUNX3 in Head and Neck Cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.112, p.387–393, 2011.

KULKARNI, M. R. Head and neck cancer burden in India. **Inter J of Head and Neck Surgery**, v.4, n.1, p. 29-35, 2013.

KULKARNI, V.; SARANATH, D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. **Oral Oncol**, v.40, p. 145–153, 2004.

LEBRUN, J-J. The dual role of TGF β in human cancer: from tumor suppression to cancer metastasis. **ISRN Molecular Biology**, 2012, 28p.

LI, C. et al. mRNA expression and hypermethylation of tumor suppressor genes apoptosis protease activating factor-1 and death-associated protein kinase in oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, n. 6, p. 280-286, 2013.

LI, Q. L. et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. **Cell**, v.109, p.113–124, 2002.

LIU, Y. et al. DAPK promoter hypermethylation in tissues and body fluids of oral precancer patients. **Med Oncol.**, n.29, p.729–733, 2012.

LLEWELLYN, C. D. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. **Oral Oncol**, v. 39, p. 106-114, 2003.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. A. S. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. **Oral Oncol**, v. 37. p. 401-418, 2001.

LONG, C. et al. Promoter hypermethylation of the RUNX3 gene in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Invest**, v.25, p. 685–690, 2007.

LOU, W. et al. Methylation of the CD44 Metastasis Suppressor Gene in Human Prostate Cancer. **Cancer Research**, v.59, p. 2329–2331, 1999.

MASSANO, M. D. et al. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.102, p. 67-76, 2006.

MCLAUGHLIN, J. K. et al. Dietary factors in oral and pharyngeal cancer. **J Natl Cancer Inst**, v.80, p. 1237-1243, 1988.

MEHROTRA, R, YADAV, S. Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. **Indian Journal of Cancer**, v. 43, n.2, p. 60-66, 2006.

MENESES, I. S. et al. Death-associated protein kinase is underexpressed in high-grade oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Morphol.**, v.28, n.2, p. 609-613, 2010.

MOON, S. et al. RUNX3 confers sensitivity to pheophorbide a-photodynamic therapy in human oral squamous cell carcinoma cell lines. **Lasers Med Sci**, 2013.

MORGAN, H. D. et al. Epigenetic reprogramming in mammals. **Hum Mol Genet**, v.14, n.1, p. 47–58, 2005.

NAKAGAWACHI, Y. et al. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. **Oncogene**, n.22, p. 8835–8844, 2003.

NAKAYAMA, M. et al. Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. **Blood**, v. 92, p. 4296–4307, 1998.

NAKAYAMA, S. et al. E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. **Int J Cancer**, v.93, p. 667–73, 2001.

NEVADUNSKY, N.S. et al. RUNX3 protein is overexpressed in human epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v.112, p.325–330, 2009.

NISHIGAKI, M. et al. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. **Cancer Res.**, v.65, p. 2115–2124, 2005.

NISHIMAKI, H. et al. A role of activated Sonic hedgehog signaling for the cellular proliferation of oral squamous cell carcinoma cell line. **Biochem Biophys Res Commun**, v.314, p.313–320, 2004.

NOMOTO, S. et al. Adverse prognosis of epigenetic inactivation in RUNX3 gene at 1p36 in human pancreatic cancer. **Br J Cancer**, n.98, p.1690–1695, 2008.

O-CHAROENRAT P. et al. Tumor thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. **Oral Oncol**, v.39, p. 386-390, 2003.

OGBUREKE, K. U. E. et al. Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. **Oral Oncol**, v.43, n.9, p. 920-32, 2007.

PENG, Z. et al. RUNX3 inhibits the expression of vascular endothelial growth factor and reduces the angiogenesis, growth, and metastasis of human gastric cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.12, p. 6386–6394, 2006.

PETTI, S. Lifestyle Risk Factors for Oral Cancer. **Oral Oncology**, v.45, n. 4,p. 340-350, 2009.

PIYATHILAKE, C. J. et al. Pattern of nonspecific (or global) DNA methylation in oral carcinogenesis. **Head Neck.**, v.27, n.12, p. 1061–1067, 2005.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. 2014. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>. Acesso em: novembro 2013.

RAGIN, C.C.R.; F. MODUGNO, F.; GOLLIN, S.M. The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. **J Dent Res**, v. 86, n.2, p. 104-114, 2007.

RAMQVIST, T.; DALIANIS, T. Oropharyngeal Cancer Epidemic and Human Papillomavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.11, 2010.

RAVEH, T.; KIMCHI, A. DAP Kinase—a proapoptotic gene that functions as a tumor suppressor. **Experimental Cell Research**, v.264, p. 185–192, 2001.

RIVERO, E. R. C.; NUNES, F. D. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. **Braz Oral Res**, v.20, n.1, p. 21-24, 2006.

RODRIGUES, V. C.; MOSS, S. M.; TUOMAINEN, H. Oral cancer in the UK: to screen or not screen. **Oral Oncol**, v. 34, p. 454–465, 1998.

RODRÍGUEZ, M.J. et al. Loss of expression of DNA repair enzyme MGMT in oral leukoplakia and early oral squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, v.245, p. 263–268, 2007.

ROSAS, S. L. B. et al. Promoter Hypermethylation Patterns of p16, O6-Methylguanine-DNA methyltransferase, and Death-associated Protein Kinase in Tumors and Saliva of Head and Neck Cancer Patients. **Cancer Res**, v.61, p. 939–942, 2001.

SAILASREE, R. et al. Differential roles of p16INK4A and p14ARF genes in prognosis of oral carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v.17, n.2, 414–420, 2008.

SAKATANI, T. et al. Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. **Science**, v.307, p. 1976–1978, 2005.

SANCHEZ-CESPEDES, M. et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. **Cancer Research**, n.60, p. 892–895, 2000.

SANDERSON, R. J.; IRONSIDE, J. A. D. Squamous cell carcinomas of the head and neck. **British Medical Journal**, v.325, p. 822-827, 2002.

SANTORO, A. et al. Epigenetic Profiling of Oral Cancer. In: OGBUREKE, K. U. E. (Ed.). **Oral Cancer**. InTech, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/oral-cancer/epigenetic-profiling-of-oral-cancer>>. Acesso em: agosto 2014.

SAWHNEY, M. et al. MGMT expression in oral precancerous and cancerous lesions: Correlation with progression, nodal metastasis and poor prognosis. **Oral Oncology**, v.43, p. 515– 522, 2007.

SCHANTZ, S. P.; YU, G. P. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.128, p. 268—274, 2002.

SCHWARTZ, S. M. et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst**, n. 90, p. 1626–1636, 1998.

SHAW, R. The epigenetics of oral cancer. Int. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.35, p. 101–108, 2006.

SHAW, R. J. et al. Promoter methylation of P16, RAR β , E-cadherin, cyclinA1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. **Br J Cancer.**, v.94, n.4, p. 561–568, 2006.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**, v.274, n.5293, p. 1672-1677, 1996.

SNEATH, R. J. S.; MANGHAM, D. C. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, v.51, p.191–200, 1998.

SOARES, H. A. Manual de câncer bucal. Conselho Regional de Odontologia do Estado de São Paulo; 2ª edição; Biênio 2005/2007.

STADLER, M. E. et al. Molecular Biology of Head and Neck Cancer: Risks and Pathways. **Hematol Oncol Clin N Am**, p. 1099–1124, 2008.

STEWART, B. W.; KLEIHUES, P. (Ed). World Cancer Report. WHO International Agency for Research on Cancer, Lyon: IARC Press, 2003.

SU, P. F. et al. p16 (INK4A) promoter hypermethylation is associated with invasiveness and prognosis of oral squamous cell carcinoma in an age-dependent manner. **Oral Oncol.**, v.46, n.10, p. 734–739, 2010.

SUBRAMANIAM, M. M. et al. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1796, p. 315–331, 2009.

SUPIC, G. et al. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Oncology**, v.45, p. 1051–1057, 2009.

_____. Hypermethylation of RUNX3 but not WIF1 gene and its association with stage and nodal status of tongue cancers. **Oral Diseases**, v.17, p. 794–800, 2011a.

_____. Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, v.47, n.8, p. 702–708, 2011b.

_____. Hypermethylation of RUNX3 but not WIF1 gene and its association with stage and nodal status of tongue cancers. **Oral Diseases**, v.17, p. 794–800, 2011.

TAIOLI, E. et al. Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. **BMC Cancer**, v.9, p. 354, 2009.

TAKAHASHI, K. et al. CD44 hyaluronate binding influences growth kinetics and tumorigenicity of human colon carcinomas. **Oncogene**, v.11, p. 2223–32, 1995

TATE, P. H.; BIRD, A. P. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. **Curr Opin Genet Dev**, v.3, p. 226-231, 1993.

TIWARI, R. Squamous cell carcinoma of the superior gingivolabial sulcus. **Oral Oncol**, v.36, p. 461-465, 2000.

TSOU, J. A. et al. DNA methylation analysis: A powerful new tool for lung cancer diagnosis. **Oncogene**, v.21, p. 5450-5461, 2002.

TSUNEMATSU, T. et al. RUNX3 has an oncogenic role in head and neck cancer. **PLoS One**, v.4, n.6, 2009.

VISWANATHAN1, M.; TSUCHIDA, N.; SHANMUGAM, G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hmlh1, mgmt and e-cadherin in oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, v.105, p. 41–46, 2003.

VON ZEIDLER, S. V. et al. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. **Int J Mol Med**, v.14, n.5, p. 807–811, 2004.

WAKI, T. et al. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. **Cancer Sci.**, v.94, p. 360–364, 2003.

WALSH, C. P.; CHAILLET, J. R.; BESTOR, T. H. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. **Nat. Genet.**, v.20, p. 116–117, 1998.

WARNAKULASURIYA, S. Global Epidemiology of Oral and Oropharyngeal Cancer. **Oral Oncology**, v.45, n.4, p. 309-316, 2009.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Tobacco Smoke and Involuntary Smoking**. Lyon: WHO Press, v.83, 2002. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/volume83.pdf>>. Acesso em: julho 2014.

_____. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines. Lyon: WHO Press, v. 89, 2007. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/recentpub/mono89.pdf>>. Acesso em: junho 2014.

WINN, D. M. Epidemiology of cancer and other systemic effects associated with the use of smokeless tobacco. **Adv Dent Res**, v.11, n.3, p.313-2, 1997.

WISEMAN, S. M. et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers and nondrinkers: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcomes. **Ann Surg Oncol**, v.10, p.551-557, 2003.

WOLFF, E. M. et al. RUNX3 methylation reveals that bladder tumors are older in patients with a history of smoking. **Cancer Res**, v.68, p.6208–6214, 2008.

WONG, Y-K.; LEE, L-T.; LIU, C-J. Hypermethylation of MGMT and DAPK gene promoters is associated with tumorigenesis and metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Dental Sciences**, n.6, p. 158-164, 2011.

WOODCOCK, C. L. Chromatin architecture. **Current Opinion in Structural Biology**, v.16, n.2, p. 213–220, 2006.

WORSHAM, M. J. et al. Molecular Characterization of Head and Neck Cancer: How Close to Personalized Targeted Therapy? **Mol Diagn Ther**, v.16, n.4, p. 209–222, 2012.

WÜNSCH FILHO, F. et al. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**, v.13, n.2, p. 175-87, 2010.

YALNIZ, Z. et al. Simultaneous Methylation Profiling of Tumor Suppressor Genes in Head and Neck Cancer. **Dna and Cell Biology**, v.30, n.1, p.17–24, 2011.

YAMAMURA, Y. et al. RUNX3 cooperates with FoxO3a to induce apoptosis in gastric cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v.281, p. 5267–5276, 2006.

YAN, P. et al. Hypermethylation-mediated regulation of CD44 gene expression in human neuroblastoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v.36, n.2, p. 129-138, 2003.

YANAGAWA, N. et al. Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. **Lung Cancer**, v.58, p.131–138, 2007.

YOO, C.B. et al. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nat. Rev. Drug Discov**, v. 5, p. 37–50, 2006.

ZUO, C. et al. O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene: Epigenetic Silencing and Prognostic Value in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v.13, p. 967-975, 2004.

ANEXO - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

Vitória, 27 de junho de 2011.

Projeto No: **318/2011**

Parecer: **21/2011** ☐ Inicial ☒ Conclusão

Título: **Estudo de Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil**

Instituição: **Hospital Santa Rita de Cássia**

Pesquisador: **José Roberto V de Podestá**

Grupo e Área Temática Especial: **IA**

Prezado Pesquisador

Após o recebimento e apreciação do projeto e das respostas as pendências formuladas, seguem as observações deste Comitê:

1. Adequar os objetivos de acordo com hipóteses formuladas em linha com a justificativa do projeto.

Parecer do CEP: pendência atendida

2. Incluir, na metodologia os critérios de seleção (inclusão e exclusão) amostral assim como características outras que sejam pertinentes. Explicitar, ainda na metodologia, o estudo piloto, e sua metodologia.

Parecer do CEP: Pendência atendida. O estudo piloto não foi contemplado na metodologia, mas é citado na página 17.

3. Justificar ausência do cálculo amostral

Parecer do CEP: Pendência atendida. É citado na página 10 (metodologia) que a amostra será de conveniência.

4. Adequar o TCLE à CNS 347/05 de Janeiro 2005 e incluir campos para identificação de quem aplicou o TCLE. É direito inalienável do sujeito de pesquisa saber ou não querer saber sobre seus resultados de exames realizados em sua propriedade biológica, tenha ou não aplicabilidade clínica. Pede-se, portanto, para rever a informação sobre o tema no TCLE.

Parecer do CEP: pendência atendida. TCLE devidamente adequado e, sobe nossa avaliação, dentro dos critérios éticos e alinhados com a resolução 196/1996 e suas complementares.





Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

Parecer do CEP: pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

Parecer do CEP: pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

Parecer do CEP: pendência atendida

CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

APROVADO

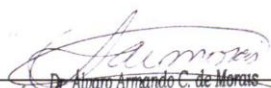
É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,


Dr. Alvaro Armando C. de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do CIAS

